



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

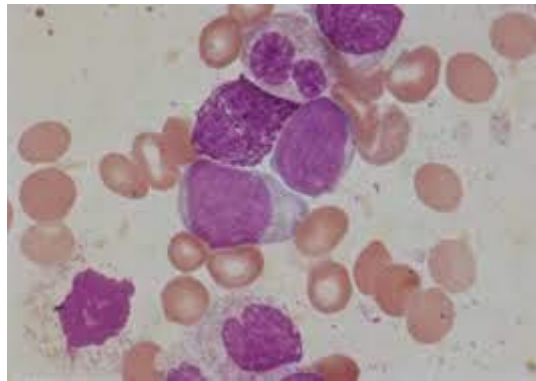
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

Διπλωματική εργασία με τίτλο:

**Ωσμωτική αντίσταση RBCs σε ασθενείς με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα**



**ΣΥΓΓΡΑΦΕΑΣ:**

**ΠΑΠΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ**

**A.M.:18678026**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:**

**ΚΡΙΕΜΠΑΡΔΗΣ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ**

**Καθηγητής ΠΑ.Δ.Α.**

Αθήνα, 2024



UNIVERSITY OF WEST ATTICA

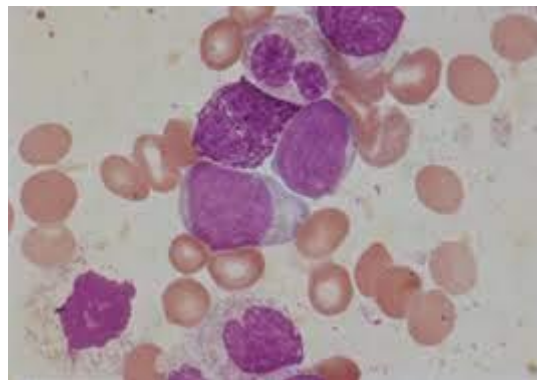
SCHOOL OF HEALTH AND CARE SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES

SECTOR OF MEDICAL LABORATORIES

Diploma thesis entitled:

**Osmotic resistance of RBCs in patients with myelodysplastic syndromes**



**WRITER:**

**PAPAS DIMITRIOS**

**Candidate number: 18678026**

**SUPERVISOR:**

**KRIEMPARDIS ANASTASIOS**

**Professor of UNIWA**

Athens, 2024





UNIVERSITY OF WEST ATTICA  
SCHOOL OF HEALTH AND CARE SCIENCES  
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES  
SECTOR OF MEDICAL LABORATORIES

Διπλωματική εργασία με τίτλο:

**Ωσμωτική αντίσταση RBCs σε ασθενείς με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα**

**ΜΕΛΗ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΕΙΣΗΓΗΤΗ**

Η διπλωματική εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι εξεταστική επιτροπή:

<b>ΟΝΟΜΑ ΕΠΩΝΥΜΟ</b>	<b>ΒΑΘΜΙΔΑ/ ΙΔΙΟΤΗΤΑ</b>	<b>ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ</b>
<b>Αναστάσιος Κριεμπάρδης</b>	<b>Καθηγητής</b>	
<b>Σωτήριος Φόρτης</b>	<b>Ακ. Υπότροφος</b>	
<b>Βασίλειος Μπίρτσας</b>	<b>Ακ. Υπότροφος</b>	

## ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος **ΠΑΠΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ** του **ΣΠΥΡΙΔΩΝΑ**, με Αριθμό Μητρώου 18678026 φοιτητής του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής **ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ** του Τμήματος **ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Ο Δηλών

Εισηγητής

Δημήτριος Παπάς

Αναστάσιος Κριεμπάρδης

Καθηγητής

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε την περίοδο Μαΐου– Δεκεμβρίου 2022 στα πλαίσια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας στο <<Εργαστήριο Αξιοπιστίας και Ποιοτικού Ελέγχου στην Εργαστηριακή Αιματολογία>> που ανήκει στο τμήμα των Βιοϊατρικών Επιστημών του ΠΑΔΑ.

Θα ήθελα πρώτα απ’ όλα να ευχαριστήσω τον καθηγητή και εισηγητή μου **κ. Αναστάσιο Κριεμπάρδη**, Καθηγητή του Τμήματος, τόσο για την αμέριστη βοήθεια του στην συγγραφή της εργασίας μου όσο και για την σπουδαία εκπαίδευση που μου παρείχε στις εργαστηριακές τεχνικές αλλά και στο γνωστικό αντικείμενο των Βιοϊατρικών Επιστημών. Επίσης τον ευχαριστώ πολύ για την υπομονή που επέδειξε όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την **κ. Χαρά Γεωργατζάκου**, για την πολύτιμη βοήθεια της στην εκπαίδευσή μου στα εργαστηριακά πρωτόκολλα αλλά και για τις χρήσιμες θεωρητικές γνώσεις που μου μετέδωσε.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον **κ. Σωτήριο Φόρτη**, Ακαδημαϊκό Υπότροφο του τμήματος, για τις αξιοσημείωτες συμβουλές αλλά και για την τεχνική υποστήριξη που μου παρείχε στην διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Επιπρόσθετα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον **κ. Βασίλειο Μπίρτσα**, Ακαδημαϊκό Υπότροφο του τμήματος, για τη συμμετοχή του στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου που πίστεψαν σε εμένα μέχρι το τέλος και με στήριξαν σε όλες τις δύσκολες στιγμές.

## Περίληψη

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η επίδραση των Μυελοδυσπλαστικών Συνδρόμων (MDS) στην ωσμωτική αντίσταση των ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBCs). Η ωσμωτική αντίσταση των ερυθρών αιμοσφαιρίων ή ωσμωτική ευθραυστότητα χρησιμοποιείται για να περιγράψει την δράση διαφόρων παραγόντων στις ωσμωτικές ιδιότητες της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων. Σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της ωσμωτικής ευθραυστότητας διαδραματίζει η ζώνη 3 και η υδατοπορίνη-1 της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, ενώ στην διαδικασία αυτή συμβάλει η ηλικία του ανθρώπου και η ακτινοβολία που χρησιμοποιείται. Αναφέρεται ο τρόπος οξειδωσης των πρωτεϊνών, των μικρομοριακών μεταβολιτών, των λιπιδίων των RBCs και η συσχέτιση της ωσμωτικής αντίστασής τους με την αιμόλυση πριν, μετά και κατά την διάρκεια της αποθήκευσής τους. Οι ασθενείς με MDS παρουσιάζουν αναποτελεσματική ερυθροποίηση με αυξημένους πρώιμους ερυθροειδείς προγόνους, πρόβλημα στο μονοπάτι των σηματοδοτών SMAD και μειωμένα επίπεδα μικροκυστιδίων των ερυθρών αιμοσφαιρίων (RMVs) που προκαλούν αιμορραγικές διαταραχές. Η υπερφόρτωση του σιδήρου σε ασθενείς με MDS οδηγεί σε αυξημένο κυτταρικό θάνατο και νοσηρότητα. Η συσσώρευση δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και οι μεταλλάξεις παράγοντα ματίσματος που βρίσκονται στις πρωτεΐνες SF3B1, U2AF και SRSF2 εμφανίζουν συσχέτιση με τα MDS. Η διάγνωση των MDS βασίζεται στην κυτταροπενία, στην μορφολογική δυσπλασία των αιμοποιητικών στοιχείων και στα κυτταρογενετικά γενετικά στοιχεία κλωνικής αιμοποίησης (έλλειψη του μεγάλου βραχίονα του 5<sup>ου</sup> χρωμοσώματος). Το Μυελοδυσπλαστικό Σύνδρομο-Δακτυλιοειδών Σιδηροβλαστών διαχωρίζεται σε MDS-RS με δυσπλασία μονής γραμμής γενεαλογίας (SLD) και σε MDS-RS με δυσπλασία πολλαπλών γενεαλογιών (MLD).

Στη συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε δείγματα ασθενών με MDS που αποσκοπούσαν στην μεταβολή της ωσμωτικής αντίστασης των ερυθρών αιμοσφαιρίων τους κατά την άμεση χρησιμοποίησή τους και μετά από την αύξηση της θερμοκρασίας κατά την αποθήκευσή τους. Για αυτόν τον λόγο μελετήθηκε η διάμεση τιμή της ωσμωτικής ευθραυστότητας (MCF), δηλαδή ο βαθμός αιμόλυσης και η ανθεκτικότητα των RBCs σε υπότονο και ισότονο μέσο, σε ασθενείς με MDS και

σε υγιείς μάρτυρες ελέγχου (controls). Η ανάλυση αυτή κατέδειξε ίδια MCF για τους ασθενείς και για τους υγιείς μάρτυρες. Όμως παρατηρήθηκε αυξημένη MCF μετά από επώαση 24 ωρών στους 37°C στους ασθενείς με MDS σε σχέση με την MCF τους μία ημέρα πριν (άμεση MCF), όπως συνέβη το ίδιο και για τα υγιή άτομα. Επιπλέον στους ασθενείς εντοπίστηκε μειωμένος αριθμός RBCs, αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων (WBCs), αιματοκρίτης (Hct), μειωμένη αιμοσφαιρίνη (Hb) και αυξημένο εύρος κατανομής ερυθρών αιμοσφαιρίων (RDW) από τους αντίστοιχους υγιείς μάρτυρες ελέγχου.



## Abstract

The aim of this study is to investigate the effect of Myelodysplastic Syndromes (MDS) on the osmotic resistance of red blood cells (RBCs). RBCs osmotic resistance or osmotic fragility is used to describe the effect of various factors on the osmotic properties of the RBC membrane. Zone 3 and aquaporin-1 of the erythrocyte membrane play an important role in the process of osmotic fragility, while the age of the person and the radiation used to contribute this process. The mode of oxidation of proteins, micromolecular metabolites, lipids of RBCs and the correlation of their osmotic resistance with haemolysis before, after and during storage is reported. MDS patients present with inefficient erythropoiesis with increased early RBC progenitors, a problem in the SMAD signaling pathway and reduced RBC microcystidic levels causing bleeding disorders. Iron overload in patients with SMAD leads to increased cell death and morbidity. Accumulation of reactive oxygen species (ROS) and splicing factor mutations found in SF3B1, U2AF and SRSF2 proteins show an association with MDS. The mode of oxidation of proteins, micromolecular metabolites, lipids of RBCs and the correlation of their osmotic resistance with haemolysis before, after and during storage is reported. MDS patients exhibit inefficient erythropoiesis with increased early erythroid progenitors, a problem in the SMAD signaling pathway, and reduced levels of red blood cell microvesicles (RMVs) that cause bleeding disorders. Iron overload in patients with SMAD leads to increased cell death and morbidity. Accumulation of reactive oxygen species (ROS) and splicing factor mutations located in the SF3B1, U2AF and SRSF2 proteins show an association with MDS. The diagnosis of MDS is based on cytopenia, morphological dysplasia of haematopoietic elements and cytogenetic genetic evidence of clonal haematopoiesis (lack of the long arm of the 5th chromosome). Myelodysplastic Syndrome-Ring Sideroblasts is divided into MDS-RS with single lineage dysplasia (SLD) and MDS-RS with multiple lineage dysplasia (MLD).

In this particular study, experiments were carried out on samples from patients with MDS aimed at changing the osmotic resistance of their red blood cells during their immediate use and after increasing the temperature during their storage. For this reason, the median corpuscular fragility (MCF), i.e. the degree of hemolysis and the

resistance of RBCs to hypotonic and isotonic media in MDS patients and was studied in patients with MDS and in healthy controls. This analysis demonstrated identical MCF for patients and healthy controls. However, an increased MCF was observed after 24 h incubation at 37°C in MDS patients compared to their MCF one day before (immediate MCF), as was the case for healthy individuals. In addition, decreased RBCs, white blood cells (WBCs), hematocrit (Hct), decreased hemoglobin (Hb) and increased red blood cell distribution width (RDW) were detected in the patients than their respective healthy controls.

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

TGFβ: μετασχηματιστικός αυξητικός παράγοντας β (βήτα) (transforming growth factor beta)

RBCs: Ερυθρά αιμοσφαίρια (Red Bloods Cells)

EPO: Ερυθροποιητίνη (erythropoietin)

MDS: Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα-ΜΔΣ (Myelodysplastic Syndromes)

AML: Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία-ΟΜΛ (Acute Myeloid Leukemia)

PB: Περιφερικό αίμα (Peripheral Blood)

HSC: Αιμοποιητικό βλαστικό κύτταρο (Hematoietic Stem Cell)

MDS-RS: Μυελοδυσπλαστικό Σύνδρομο-Δακτυλοειδών Σιδηροβλαστών (MDS-ΔΣ) (Myelodysplastic Syndrome-Ring Sideroblasts)

BM: ΜΟ-Μυελός των Οστών (Bone Marrow)

SLD: Δυσπλασία γενεαλογίας μονής γραμμής (single lineage dysplasia)

MLD: Δυσπλασία πολλαπλών γενεαλογιών (multilineage dysplasia)

Absolute neutrophil count (ANC): Απόλυτος αριθμός ουδετερόφιλων

MCF: Διάμεση τιμή της ωσμωτικής ευθραυστότητας (median corpuscular fragility-MCF)

Osmotic Fragility Test-OFT: Τεστ ωσμωτικής ευθραυστότητας (Osmotic Fragility Test-OFT)

PNH: Παροξυσμική νυχτερινή αιμοσφαιρινουρία (paroxysmal nocturnal hemoglobinuria)

RMVs: Μικροκυστίδια των ερυθρών αιμοσφαιρίων

PS: Φωσφατιδυλοσερίνη (Phosphatidylserine)

OR: Ωσμωτική αντίσταση (Osmotic Resistance)

ROS: Δραστικές μορφές οξυγόνου

Hb: Αιμοσφαιρίνη

SCD: Δρεπανοκυτταρική νόσος (Sickle cell disease-SCD)

AQP1: Υδατοπορίνη-1 (aquaporin-1, AQP1)

EVs: Εξωκυτταρικά κυστίδια (Extracellular vesicles-EVs)

βThal+: Αιμοδότες με χαρακτηριστικά β-θαλασσαιμίας-Blood donors with beta-thalassemia traits (βThal<sup>+</sup>)

RDW: Δείκτης εύρους κατανομής ερυθρών αιμοσφαιρίων

MCV: Μέσος όγκος ερυθρών αιμοσφαιρίων

## Πίνακας περιεχομένων

<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b> .....	6
Περίληψη .....	7
Abstract .....	9
<b>ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ</b> .....	11
<b>1. Εισαγωγή</b> .....	14
1.1 Η κατανομή της ωσμωτικής αντίστασης των ερυθρών αιμοσφαιρίων .....	14
1.2 Ωσμωτική ευθραυστότητα και ζώνη 3 .....	15
1.3 Συσχέτιση ηλικίας και ωσμωτικής ευθραυστότητας της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης .....	16
1.4 Ο ρόλος της ακτινοβολίας στην ωσμωτική αντίσταση .....	17
1.5 Ο ρόλος του οξυγόνου στα RBCs.....	19
1.6 Ωσμωτική αντίσταση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και συσχέτιση με την αιμόλυση τους κατά την αποθήκευση.....	20
<b>2. Φυσιολογία ερυθρών αιμοσφαιρίων στα Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα</b> .....	22
2.1 Ερυθροποίηση.....	22
2.2 Η κυστιδοποίηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων στα Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα ..	27
2.3 Ο σίδηρος στα Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα .....	32
2.4 Το Οξειδωτικό στρες στην αιμοποιητική νησίδα.....	34
2.5 Μηχανισμοί ματίσματος στα Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα .....	35
2.6 Η διάγνωση των Μυελοδυσπλαστικών Συνδρόμων .....	36
2.7 Το Μυελοδυσπλαστικό Σύνδρομο-Δακτυλιοειδών Σιδηροβλαστών.....	41
<b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	43
<b>3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	43
3.1 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	43
3.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	45
3.2.1 Υπολογισμός απορρόφησης ερυθρών αιμοσφαιρίων σε διάλυμα NaCl.....	45
3.2.2 Συλλογή και προετοιμασία δειγμάτων .....	48
<b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	49
<b>5. Συζήτηση</b> .....	51
5.1 Η ωσμωτική αντίσταση σε ασθενείς με SARS-CoV-2 και Δρεπανοκυτταρική Νόσο ....	51
5.2 Η ωσμωτική αντίσταση των ερυθρών αιμοσφαιρίων–Νανοϋλικά.....	53
5.3 Αποθήκευση του αίματος .....	53
<b>6. Βιβλιογραφία:</b> .....	61

## 1. Εισαγωγή

### 1.1 Η κατανομή της ωσμωτικής αντίστασης των ερυθρών αιμοσφαιρίων

Η ωσμωτικότητα του πλάσματος του αίματος των θηλαστικών διατηρείται στο εύρος 270-310 mosmol. Οι κύριες ουσίες που ρυθμίζουν τις ωσμωτικές ιδιότητες είναι τα κατιόντα, για παράδειγμα, το νάτριο (136–145 mM) και το κάλιο (3,6–5,4 mM) και τα ανιόντα, για παράδειγμα, το χλώριο και το όξινο ανθρακικό. Οι μοριακές συγκεντρώσεις άλλων ωσμωτικά ενεργών μεταβολιτών, όπως η ουρία, η γλυκόζη και οι πρωτεΐνες του πλάσματος, είναι χαμηλές, αλλά ευθύνονται για την κολλοειδή ογκώδη πίεση 8-12 mosmol. Ο βαθμός αντίστασης των ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBCs) στη λύση ως αποτέλεσμα της μείωσης της συγκέντρωσης NaCl στο περιβάλλον τους είναι η βάση της δοκιμής της ωσμωτικής ευθραυστότητας. Πειραματικά, η συμβατική ωσμωτική δοκιμή ευθραυστότητας συνίσταται στη μέτρηση της έντασης του φωτός που μεταδίδεται μέσω ενός διαλύματος Hb που παράγεται από ελαιώδη ερυθροκυττάρων σε ένα υποτονικό μέσο. Το μήκος κύματος φωτός που χρησιμοποιείται συνήθως είναι  $\lambda = 540 \text{ nm}$ , όπου μόνο η αιμοσφαιρίνη, ως κύρια πρωτεΐνη των RBCs, συμβάλλει στην απορρόφηση του φωτός. Η ωσμωτική ευθραυστότητα ορίζεται από μετατοπίσεις στην καμπύλη αιμόλυσης, η οποία συσχετίζει την απορρόφηση με τη συγκέντρωση NaCl, και συχνά καθορίζεται με τον προσδιορισμό του 50% των σημείων αιμόλυσης. (1)

Η ωσμωτική ευθραυστότητα χρησιμοποιείται ευρέως για να αποσαφηνιστούν οι μηχανισμοί της επίδρασης διαφορετικών παραγόντων στις ωσμωτικές ιδιότητες των μεμβρανών των ερυθροκυττάρων, όπως η διατμητική τάση και η μηχανική αιμόλυση, η θερμοκρασία, τα αποτελέσματα υπερήχων, τα φάρμακα και η ακτινοβολία. Η εξέταση της ωσμωτικής ευθραυστότητας είναι επίσης χρήσιμη για τη διάγνωση ορισμένων αιματολογικών ασθενειών, για παράδειγμα, της αιμολυτικής αναιμίας, της κληρονομικής σφαιροκυττάρωσης και ελλειπτοκυττάρωσης, της ανεπάρκειας αφυδρογονάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD) και της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας, καθώς και για τα ερυθρά αιμοσφαίρια από ουραιμικούς ή διαβητικούς ασθενείς. Η χαμηλή ωσμωτική αντίσταση μπορεί να οδηγήσει σε ενδοαγγειακή

αιμόλυση, η οποία προκαλεί μείωση της διάρκειας ζωής των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Η καμπύλη ωσμωτικής ευθραυστότητας των ερυθρών αιμοσφαιρίων όχι μόνο αντανakλά τη μέση μεμβράνη και τις κυτταροπλασματικές ιδιότητες, αλλά μπορεί επίσης να παρέχει πληροφορίες σχετικά με την κατανομή αυτών των ιδιοτήτων εντός του δείγματος. (1)

Η αιμοσφαιρίνη απελευθερώνεται μέσω των αιμολυτικών πόρων που σχηματίζονται στις τεντωμένες μεμβράνες των διογκωμένων σφαιρικών κυττάρων σε ένα υποτονικό μέσο. Η λύση του κυττάρου εμφανίζεται αμέσως μετά τη διόγκωση στο σφαιρικό του σχήμα. Κατά τη διάρκεια της ωσμωτικής αιμόλυσης, ένα RBC γίνεται μια σφαίρα με μέγιστο όγκο 1,5 έως 1,6 φορές υψηλότερο από τον όγκο των δισκοκυττάρων σε ένα ιστονικό μέσο. Η διόγκωση είναι μια περιοριστική διαδικασία της κυτταρικής λύσης. Έτσι η ωσμωτική ευθραυστότητα αντανakλά την ικανότητα του κυττάρου να προσλαμβάνει νερό σε ένα υποτονικό μέσο. Όταν η εξωτερική ωσμωτική πίεση μειώνεται, ο όγκος των κυττάρων αυξάνεται. (1)

Αναμένεται μία κατανομή των κρίσιμων όγκων που σχετίζονται με την κατανομή των κρίσιμων ωσμωτικών πιέσεων. Οι απόλυτες τιμές του ωσμωτικά μη υπεύθυνου νερού είναι περίπου 3,57 και 0,33 g νερού/γραμμάριο (g) ξηρής μάζας στο διάλυμα αιμοσφαιρίνης και στα ερυθροκύτταρα, αντίστοιχα. Προτάθηκε ότι η έκταση του ωσμωτικά μη ανταποκρινόμενου νερού συσχετίζεται με το νερό που αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη. Η αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-νερού είναι ένας παράγοντας κλειδί στον περιορισμό της διάχυσης του νερού μέσα στο κύτταρο. Ο Bogner et al. απέδειξαν ότι περίπου το 20% του ενδοκυτταρικού νερού σχετίζεται άμεσα με τις ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες σε ότι αφορά την ώσμωση στα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα. Το σχήμα της καμπύλης αιμόλυσης, που δείχνει τον βαθμό κυτταρικής λύσης ως συνάρτηση της συγκέντρωσης άλατος, προκύπτει από την συνάρτηση της κατανομής της δύναμης των μεμβρανών των ερυθροκυττάρων. (1)

## 1.2 Ωσμωτική ευθραυστότητα και ζώνη 3

Η ωσμωτική ευθραυστότητα μετρά την επεκτασιμότητα της κυτταρικής μεμβράνης σχετικά με το υποτονικό στρες. Επειδή η ωσμωτική ευθραυστότητα μετριέται με την

αλλαγή της τονικότητας, αυτή η μέθοδος είναι ευαίσθητη στις κινήσεις των ιόντων και του νερού κατά μήκος της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης. Η κατεύθυνση της ροής των ιόντων (ή του νερού) μέσω της ζώνης 3 (ή AQP1) ακολουθεί τις διαβαθμίσεις της συγκέντρωσης μεμονωμένων ιόντων (ή του νερού) εάν δεν επιβάλλεται κυτταρική ή μοριακή ρύθμιση. Η Υδατοπορίνη-1 (AQP1) και η ζώνη 3 αλληλεπιδρούν παροδικά στην επιφάνεια των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Η αλληλεπίδρασή μεταξύ πρωτεΐνης (AQP1) και πρωτεΐνης (ζώνης 3) εξαφανίζεται όταν τα ερυθρά αιμοσφαίρια διογκώνονται σε ένα υποτονικό περιβάλλον. Περιέργως, η αλληλεπίδραση μεταξύ της Υδατοπορίνης-1 (AQP1) και της ζώνης 3 στην κυτταρική μεμβράνη GP.Mur<sup>+</sup> είναι ισχυρότερη. Το πώς η αλληλεπίδρασή τους θα μπορούσε να επηρεάσει τη σταθερότητα των RBCs και την αντίσταση στο ωσμωτικό στρες είναι σε μεγάλο βαθμό ασαφές. (2)

### 1.3 Συσχέτιση ηλικίας και ωσμωτικής ευθραυστότητας της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης

Σύμφωνα με ένα κεντρικό δόγμα της βιοχημείας, η σταθερότητα είναι μια λειτουργική εκδήλωση της δομής και οποιαδήποτε αλλαγή σε μια δομή θα αλλάξει λειτουργία. Αυτή η σχέση δομής-λειτουργίας ισχύει όχι μόνο στον κόσμο των βιομορίων, αλλά ισχύει εξίσου καλά σε οργανίδια, κύτταρα, ιστούς και όργανα. (3)

Δεδομένου ότι η ρευστότητα μιας μεμβράνης φωσφολιπιδίων μειώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης της χοληστερόλης και της αναλογίας μεταξύ κορεσμένων και ακόρεστων λιπαρών οξέων μια τέτοια δομική αλλαγή θα μπορούσε να εξηγήσει τις παρατηρήσεις του Penha-Silva et al., 2007. Αυτό ενισχύεται από τις αναφερόμενες αυξημένες αναλογίες κορεσμένων προς ακόρεστα λιπαρά οξέα που παρατηρούνται

---

<sup>1</sup>Το GP.Mur είναι ένας ειδικός τύπος ερυθρών αιμοσφαιρίων με επιπολασμό 1–10% στη Νοτιοανατολική Ασία.

Στη μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων, το GP.Mur ολιγομερίζεται με τη γλυκοφορίνη A και τη ζώνη 3 και υποστηρίζει την έκφραση της ζώνης 3. Τα σύμπλοκα GP.Mur+ ζώνης (band) 3 είναι μοναδικά σε (i) ισχυρότερη σχέση με την AQP1 και (ii) διαφοροποιημένα σε δομική οργάνωση με σύμπλοκα Rh/RhAG.



στα μεμβρανικά φωσφολιπίδια των ερυθροκυττάρων από ηλικιωμένους ανθρώπους.  
(3)

Η σταθερότητα της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων θα πρέπει να αντανακλά το μέγεθος των ελκυστικών δυνάμεων Van der Waals μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων στα φωσφολιπίδια της μεμβράνης. Αυτές οι δυνάμεις αυξάνονται με αυξημένη αναλογία χοληστερόλης και κορεσμένων λιπαρών οξέων στα φωσφολιπίδια της μεμβράνης. Η αυξημένη σταθερότητα της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων που παρατηρήθηκε από τον Penha-Silva et al., 2007 με την αύξηση της ηλικίας θα μπορούσε να είναι συνέπεια προοδευτικών συνεχιζόμενων δομικών αλλοιώσεων που αποτελούν μέρος της φυσιολογικής ομοιόστασης. (3)

Ενώ ορισμένα κύτταρα μπορούν να προσαρμοστούν στις περιβαλλοντικές συνθήκες κάνοντας αλλαγές στη σύνθεση ή τη δομή της μεμβράνης, τα ερυθροκύτταρα είναι κύτταρα τελικού σταδίου, ανίκανα για βιοσύνθεση λιπιδίων. Η σύνθεση της μεμβράνης τους εξαρτάται από τις συνθήκες πλάσματος που παρέχονται από τον οργανισμό ξενιστή. (3)

#### 1.4 Ο ρόλος της ακτινοβολίας στην ωσμωτική αντίσταση

Τα ερυθροκύτταρα των θηλαστικών (RBCs) είναι ο κατάλληλος υποψήφιος για τη διερεύνηση των αποκρίσεων της κυτταρικής ακτινοβολίας για πολλούς λόγους. Πρώτα απ' όλα, είναι η υψηλή ευαισθησία στην ωσμωτική πίεση του μέσου, και η προσιτή και εύκολη στον διαχωρισμό τους λήψη κυττάρων με άθικτη μεμβράνη. Επίσης, όντας αποπυρηνωποιημένα, τα RBCs αντιπροσωπεύουν ένα χρήσιμο μοντέλο για τη μέτρηση των ιδιοτήτων της μεμβράνης χωρίς την παρεμβολή των ενδοκυτταρικών μεμβρανών και οργανιδίων. Το ερυθροκύτταρο είναι ένα εξαιρετικό εργαλείο για τη μελέτη της σταθερότητας της μεμβράνης καθώς η λύση του μπορεί να παρακολουθηθεί εύκολα. Η εξέταση της ωσμωτικής αντίστασης (ευθραυστότητας) (OR) των ερυθροκυττάρων είναι μια απλή και ευαίσθητη δοκιμασία για τη μελέτη επιρροής διαφορετικών φυσικοχημικών παραγόντων στη σταθερότητα της μεμβράνης. Οι κύριοι καθοριστικοί παράγοντες της OR των ερυθροκυττάρων είναι η αλληλεπίδραση κυτταροσκελετού-μεμβράνης των δομικών

πρωτεϊνών και η φύση της διπλοστιβάδας φωσφολιπιδίου στην κυτταρική μεμβράνη. Αποδείχθηκε ότι οι αποκρίσεις μετά την ακτινοβολία της OR του ανθρώπινου ερυθροκυττάρου στην ιονίζουσα ακτινοβολία (IR) εξαρτώνται μη γραμμικά από την απορροφούμενη δόση. (4)

Η κύρια διάκριση μεταξύ της δράσης της ιονίζουσας και της μη ιονίζουσας ακτινοβολίας συνίσταται στο ότι η δράση της πρώτης στις κυτταρικές δομές και λειτουργίες είναι μη αναστρέψιμη εξαιτίας μιας ομοιοπολικής τροποποίησης των κυτταρικών μακρομορίων. Καθώς φαίνεται η αναστρεψιμότητα της δράσης της ραδιονουκλειδικής ακτινοβολίας στην ωσμωτική αντίσταση, υποθέτεται ότι αυτές οι επιδράσεις προκαλούνται από μη ιονιζόμενο τμήμα της ακτινοβολίας. Ωστόσο, η παρατηρούμενη εκπομπή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην περιοχή υπεριώδους, ορατής και υπέρυθρης ακτινοβολίας μπορεί να είναι το αποτέλεσμα της επιβράδυνσης των ηλεκτρονίων στην αλληλεπίδρασή τους με μια ύλη. Στη συνέχεια, αυτά τα αποτελέσματα μεσολαβούνται επίσης από ακτινοβολία βήτα. Φαίνεται ότι η αναδιάταξη της δομής της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων σε πεδίο χαμηλής δόσης τιμής ακτινοβολίας αλλάζει τις λειτουργικές αποκρίσεις του κυττάρου σε σύμπλοκα που ρυθμίζουν την δραστηριότητα των καταρρακτών μεταγωγής σήματος. Το τελευταίο αποτέλεσμα θα αλλάξει με τη σειρά του την προσκόλληση μεμβράνης-κυτταροσκελετού, η οποία είναι κρίσιμη για τη σταθερότητα της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων. Σε αυτή την περίπτωση, είναι δυνατόν να αναμένεται αλλαγή της OR των ερυθροκυττάρων παρουσία του επιβαλλόμενου ιονιστικού πεδίου με χαμηλό ρυθμό δόσης εξαιτίας της τροποποίησης της δομής της μεμβράνης που προκαλείται σε ένα ερυθροκύτταρο. Η υποωσμωτική αντίσταση, η οποία καθορίζει την απελευθέρωση της αιμοσφαιρίνης από τα ερυθρά αιμοσφαίρια σε υποτονικά διαλύματα, είναι ένα γενικό μέτρο για τη σταθερότητα των πλασματικών μεμβρανών. Συνεπώς, η εξέταση της ωσμωτικής αντίστασης χρησιμοποιήθηκε για να αποκαλύψει την επίδραση των αλλαγών στη δομή της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων, που προκαλούνται από το επιβαλλόμενο πεδίο ακτινοβολίας χαμηλού ρυθμού, στη σταθερότητα της μεμβράνης. Η ωσμωτική αντίσταση θεωρείται ότι είναι συνάρτηση της βαθμίδωσης (αύξησης) της ωσμωτικής πίεσης μεταξύ του ενδοκυτταρικού και εξωκυτταρικού μέσου, της αρχικής αναλογίας του τμήματος της επιφάνειας προς τον

όγκο, της τάσης αιμόλυσης της μεμβράνης και του ιοντικού περιεχομένου του κυττάρου. Οι δύο κύριες οδοί μεταφοράς κατιόντων που πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνες για την απώλεια του  $K^+$  του κυττάρου είναι το ενεργοποιημένο με  $Ca^{2+}$  κανάλι εκροής του  $K^+$  και ο συμμεταφορέας  $K^+-Cl^-$  που ενεργοποιείται από χαμηλό pH ή υποτονικό στρες. (4)

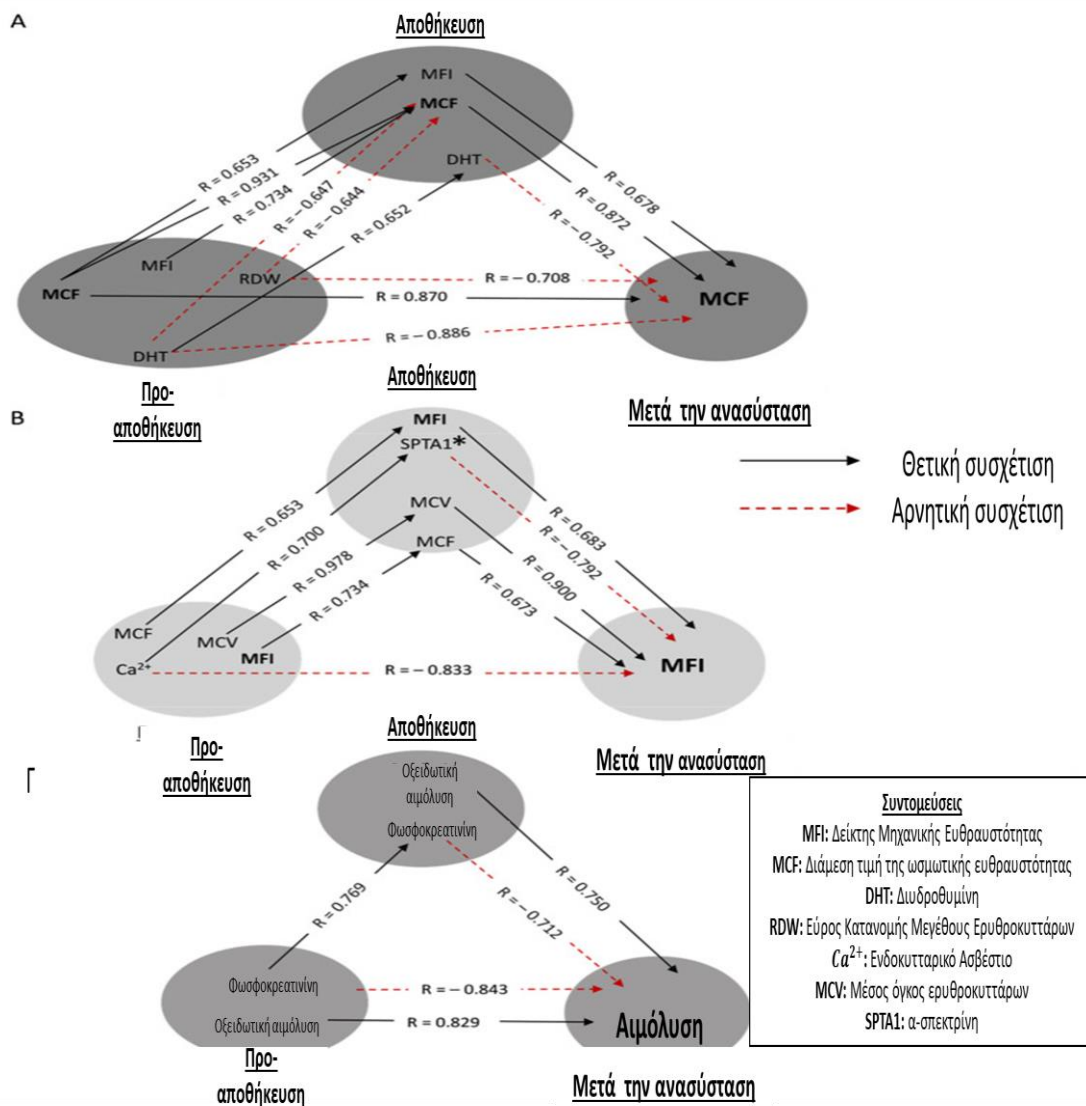
### 1.5 Ο ρόλος του οξυγόνου στα RBCs

Η εξέλιξη των ανθρώπινων ερυθρών αιμοσφαιρίων έχει μεγιστοποιήσει την ικανότητά τους να μεταφέρουν και να παρέχουν οξυγόνο στους ιστούς μέσω της προοδευτικής απώλειας πυρήνων και οργανιδίων κατά την ωρίμανση των προδρόμων ερυθροειδών σε δικτυοερυθροκύτταρα και τελικά σε ώριμα δισκοκυτταρικά ερυθρά αιμοσφαίρια. Ως αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας, κάθε ώριμο RBC περιέχει ~250-270 εκατομμύρια αντίγραφα αιμοσφαιρίνης, με την αιμοσφαιρίνη να αντιπροσωπεύει το ~ 98% του κυτταροπλασματικού πρωτεώματος και το 92% του συνολικού πρωτεώματος. Σε πλήρη κορεσμό οξυγόνου, τα RBCs μπορούν θεωρητικά να μεταφέρουν έως και 1 δισεκατομμύριο μόρια οξυγόνου/κύτταρο, μια λειτουργία που διευκολύνεται από την παρουσία όλων των ώριμων RBCs σε συνδυασμό με ~2,6 g σιδήρου (66% του συνολικού σιδήρου του σώματος). Η χημεία Fenton και Haber-Weiss παράγει συνεχώς τον σχηματισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου και των αντιδραστικών ειδών οξυγόνου, καθιστώντας τη διάρκεια ζωής των 120 ημερών στην κυκλοφορία των RBCs έναν αγώνα ενάντια στην οξείδωση των πρωτεϊνών (ειδικά τα ευαίσθητα στην οξειδοαναγωγή λειτουργικά κατάλοιπα της αιμοσφαιρίνης όπως το C93 και το H92 της βήτα αλυσίδας), των μικρομοριακών μεταβολιτών και των λιπιδίων. Κάθε μέρα, 0,2 τρισεκατομμύρια ερυθρά αιμοσφαίρια αφαιρούνται από την κυκλοφορία του αίματος και αντικαθίστανται από de novo ερυθροποίηση (2 εκατομμύρια RBCs παράγονται ανά δευτερόλεπτο), που αναλογεί στο ~40% του συνολικού κύκλου εργασιών της μάζας σώματος παρά τη μικρή μάζα κάθε RBC (στο εύρος των 100–300 pg). (5)

## 1.6 Ωσμωτική αντίσταση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και συσχέτιση με την αιμόλυση τους κατά την αποθήκευση

Η ωσμωτικά επαγόμενη αιμόλυση των πρόσφατα αναρροφημένων RBCs των δοτών με χαρακτηριστικά β-θαλασαιμίας ( $\beta\text{Thal}^+$ ) συσχετίστηκε θετικά με τη μηχανικά επαγόμενη στη μονάδα, η οποία με τη σειρά της συνδέθηκε με την ωσμωτική ευθραυστότητα μετά την αποθήκευση (Εικόνα 1A). Ο πρώτος σύνδεσμος παρατηρήθηκε επίσης αντίστροφα, δηλαδή, η μηχανική ευθραυστότητα προ-αποθήκευσης συσχετίστηκε με την ωσμωτική ευθραυστότητα κατά την αποθήκευση. Προχωρώντας στις αρνητικές συσχετίσεις, ο δείκτης εύρους κατανομής ερυθρών αιμοσφαιρίων (RDW) των πρόσφατα ανασυρόμενων ερυθρών αιμοσφαιρίων συσχετίστηκε αντιστρόφως με την ωσμωτική αιμόλυση τόσο των αποθηκευμένων όσο και των ανασυσταθέντων δειγμάτων, όπως συνέβη και με τη διυδροθυμίνη. Αυτός ο μεταβολίτης παρουσίασε αποθηκευμένα επίπεδα ανάλογα με τα *in vivo* και αντιστρόφως ανάλογα με την ωσμωτική ευθραυστότητα μετά την ανασύσταση (Εικόνα 1A). (6)

Η μηχανική αιμόλυση των ανασυσταθέντων δειγμάτων συσχετίστηκε θετικά τόσο με τη μηχανική όσο και με την ωσμωτική ευθραυστότητα των αποθηκευμένων RBCs, καθώς και με τον μέσο όγκο των ερυθρών αιμοσφαιρίων (MCV), ο οποίος κυμαινόταν αναλογικά με τα επίπεδα *in vivo* (Εικόνα 1B). Ένα ενδιαφέρον εύρημα ήταν η άμεση αρνητική σχέση μεταξύ των βασικών επιπέδων του ενδοκυτταρικού ασβεστίου και της μηχανικής αιμόλυσης υπό συνθήκες *in vitro* που μιμούνται τον δέκτη. Αυτή η σύνδεση διακόπηκε στις άλλες δύο πλευρές του τριγώνου από (α) μια θετική συσχέτιση του ασβεστίου με τις ενσωματωμένες πρωτεΐνες μεμβράνης/κυτταροσκελετού των αποθηκευμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων και (β) μια επακόλουθη αρνητική συσχέτιση του τελευταίου με τον δείκτη μηχανικής ευθραυστότητας μετά την αποθήκευση (Εικόνα 1B). (6)



**Εικόνα 1.** Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις αιμόλυσης μεταξύ του πρόσφατα ληφθέντος αίματος, των αποθηκευμένων και των ανασυσταμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων από δότες με χαρακτηριστικά βήτα-θαλασσαιμίας (βThal+). Τα τρίγωνα συσχέτισης επικεντρώνονται στην (Α) ωσμωτική, (Β) μηχανική και (Γ) αυθόρμητη αιμόλυση των ανασυσταθέντων δειγμάτων. Όλες οι συνδέσεις αντιπροσωπεύουν επαναλαμβανόμενες (σε κάθε πλάσμα παραλήπτη και μετρούμενο χρονικό σημείο αποθήκευσης) σημαντικές συσχετίσεις. Οι τιμές R αφορούν την όψιμη αποθήκευση και το θαλασσαιμικό πλάσμα. \*Η SPTA1 χρησιμοποιήθηκε ως παράδειγμα μιας σειράς δομικών στοιχείων που συσχετίζονται με τον MFI.

Τροποποιημένη από (6).

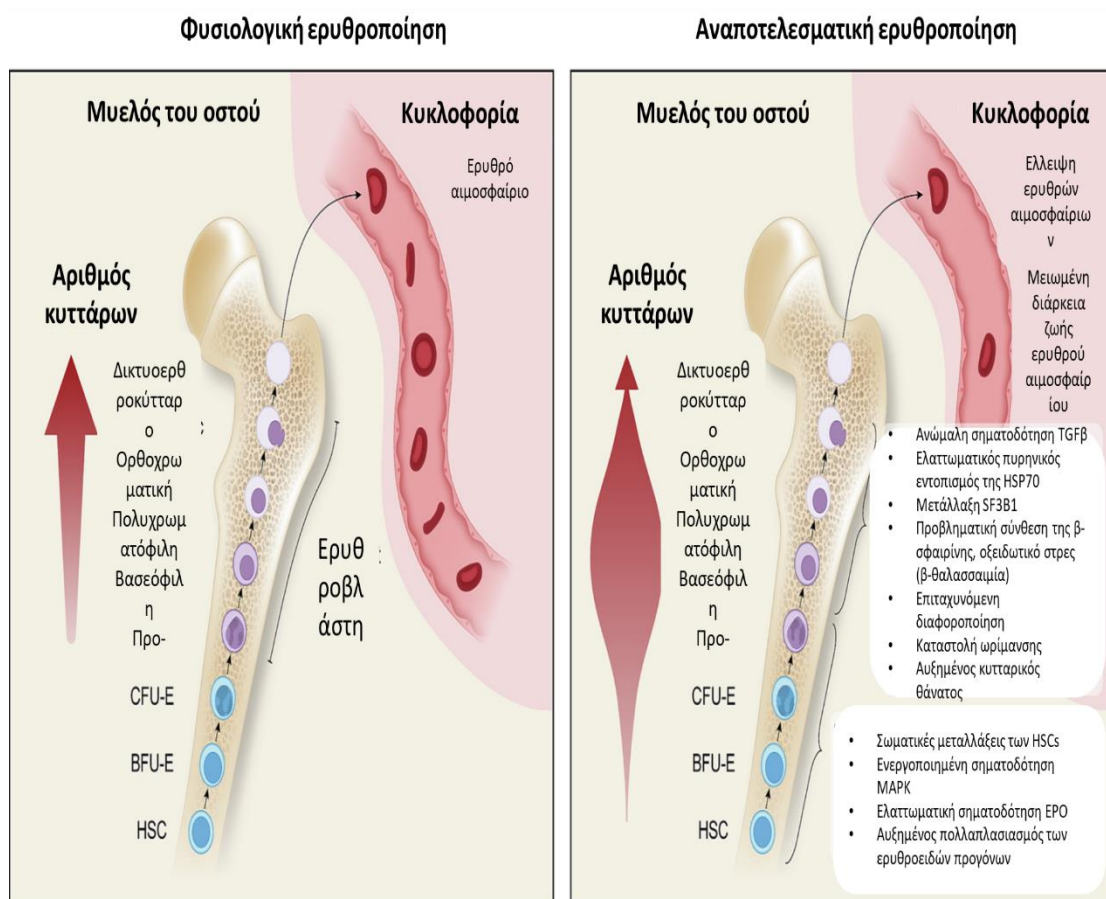
## 2. Φυσιολογία ερυθρών αιμοσφαιρίων στα Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα

### 2.1 Ερυθροποίηση

Η ερυθροποίηση είναι μια αυστηρά ρυθμιζόμενη διαδικασία μέσω της οποίας παράγονται επαρκή λειτουργικά ερυθροκύτταρα για τη διατήρηση των επιπέδων των κυκλοφορούντων ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBCs). Η ερυθροποίηση περιλαμβάνει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των προγονικών και πρόδρομων κυττάρων των RBCs για να σχηματίσουν ώριμα RBCs (Εικόνα 2). Αυτή η διαδικασία διευκολύνεται από ένα πολύπλοκο σύνολο παραγόντων μεταγραφής, κυτταροκινών και μορίων σηματοδότησης. Ο GATA1 θεωρείται ο κύριος μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει τη δέσμευση της ερυθροειδής γενεαλογίας. Ρυθμίζει την έκφραση πολλών γονιδίων που εμπλέκονται στην ερυθροποίηση, συμπεριλαμβανομένων εκείνων για την παραγωγή αίμης και σφαιρίνης, αντι-αποπτωτικών παραγόντων και του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης. Η ερυθροποιητίνη, η οποία απελευθερώνεται από τον νεφρό υπό συνθήκες υποξίας, δρα σε συνέργεια με τον παράγοντα των βλαστοκυττάρων για τη ρύθμιση της ερυθροποίησης στα πρώιμα και όψιμα στάδια της διαφοροποίησης των προγονικών ερυθροειδών και στη συνέχεια μόνη της από τα τελικά στάδια της διαφοροποίησης των προγονικών ερυθροειδών έως τα πρώιμα στάδια της ωρίμανσης των πρόδρομων ερυθροειδών. Στα μεταγενέστερα στάδια της ωρίμανσης των πρόδρομων ερυθροειδών, άλλα υψηλά συντονισμένα σήματα ρυθμίζουν πιο έντονα την εξέλιξη της ερυθροποίησης, όπως οι συνδέτες της υπεροικογένειας του μετασχηματιστικού αυξητικού παράγοντα β (TGFβ) (συμπεριλαμβανομένων των ακτιβινών) και η οδός σηματοδότησης SMAD. Ελαττώματα ή ανωμαλίες στην παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων, γνωστές ως αναποτελεσματική ερυθροποίηση και χαρακτηριζόμενες από ανώμαλη ωρίμανση προδρόμου ερυθροειδών τελικού σταδίου (Εικόνα 2), μπορεί να οδηγήσουν σε αναιμία, η οποία μπορεί να μειώσει σημαντικά την ποιότητα ζωής και συνδέεται συνήθως με κόπωση, αδυναμία, ζάλη και πονοκέφαλο. (7)

Η ερυθροποίηση περιλαμβάνει τη διαφοροποίηση ενός αιμοποιητικού βλαστικού κυττάρου (HSC) στο μυελό των οστών σε μυελοειδή πρόγονο, ο οποίος περαιτέρω

διαφοροποιείται σε προγονικό μεγακαρυοκύτταρο-ερυθροειδές πριν δεσμευτεί στην ερυθροειδή σειρά ως BFU-E και στη συνέχεια κύτταρα μονάδας-ερυθροειδούς CFU-E που σχηματίζουν αποικία. Η ερυθροποίηση, που λαμβάνει χώρα σε ερυθροβλαστικές νησίδες του μυελού των οστών, μπορεί να κατηγοριοποιηθεί ευρέως σε πρώιμα και όψιμα στάδια διαφοροποίησης και ωρίμανσης. Κατά τη διάρκεια των πρώιμων και όψιμων σταδίων διαφοροποίησης και της πρώιμης φάσης ωρίμανσης, οι προερυθροβλάστες – οι πιο πρώιμοι μορφολογικά αναγνωρίσιμοι ερυθροβλάστες – διαφοροποιούνται σε βασεόφιλους και στη συνέχεια σε πολυχρωματόφιλους ερυθροβλάστες. Αυτή η διαδικασία συνοδεύεται από σταδιακή μείωση του μεγέθους των κυττάρων και του πυρήνα. Κατά τη διάρκεια της ερυθροποίησης τελικού σταδίου της ωρίμανσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων, οι πολυχρωματόφιλοι ερυθροβλάστες διαφοροποιούνται περαιτέρω σε ορθοχρωματικούς ερυθροβλάστες, δικτυοερυθροκύτταρα και τέλος, ερυθροκύτταρα. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας διαφοροποίησης και ωρίμανσης, η αιμοσφαιρίνη συσσωρεύεται και το κύτταρο συνεχίζει να συρρικνώνεται και τελικά αποβάλλει τον πυρήνα του για να γίνει ένα ώριμο δικτυοερυθροκύτταρο και στη συνέχεια, στην κυκλοφορία του αίματος, ένα ερυθρό αιμοσφαίριο (RBC). Αντίθετα, η αναποτελεσματική ερυθροποίηση χαρακτηρίζεται από αυξημένη επέκταση και επιταχυνόμενη διαφοροποίηση των πρώιμων ερυθροειδών προγόνων, ακολουθούμενη από αναστολή της τελικής διαφοροποίησης και αυξημένο προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, οδηγώντας σε μη βέλτιστη παραγωγή ώριμων ερυθροκυττάρων. (7)



**Εικόνα 2.** Φυσιολογική (στην αριστερή εικόνα) κι αναποτελεσματική (στην δεξιά εικόνα) ερυθροποίηση. HSP70: πρωτεΐνη θερμικού σοκ 70 (heat shock protein), MAPK: ενεργοποιημένη με μιτογόνο πρωτεϊνική κινάση (mitogen activated protein kinase), SF3B1: συντελεστής ματίσματος 3B υπομονάδα 1 (splicing factor 3B subunit 1).

Προσαρμοσμένη από (7).

Η κανονική σηματοδότηση από σύμπλοκα συνδέτη-υποδοχέα στην υπεροικογένεια του TGF-β μεσολαβείται ενδοκυτταρικά από SMAD, τα οποία σχηματίζουν δύο κλάδους μονοπατιών που περιλαμβάνουν SMAD2/3 και SMAD1/5/8. Οι (πρωτεΐνες) SMADs είναι σημαντικοί φυσιολογικοί ρυθμιστές της αιμοποίησης. Η συμμετοχή των SMAD2/3 αποδεικνύεται καλύτερα από τον εξέχοντα ρόλο του TGF-β στην ηρεμία και την αυτοανανέωση των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων καθώς και από την ικανότητά τους να διεγείρουν και/ή να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων κυτταρικών σειρών. Όπως συζητείται λεπτομερώς παρακάτω,

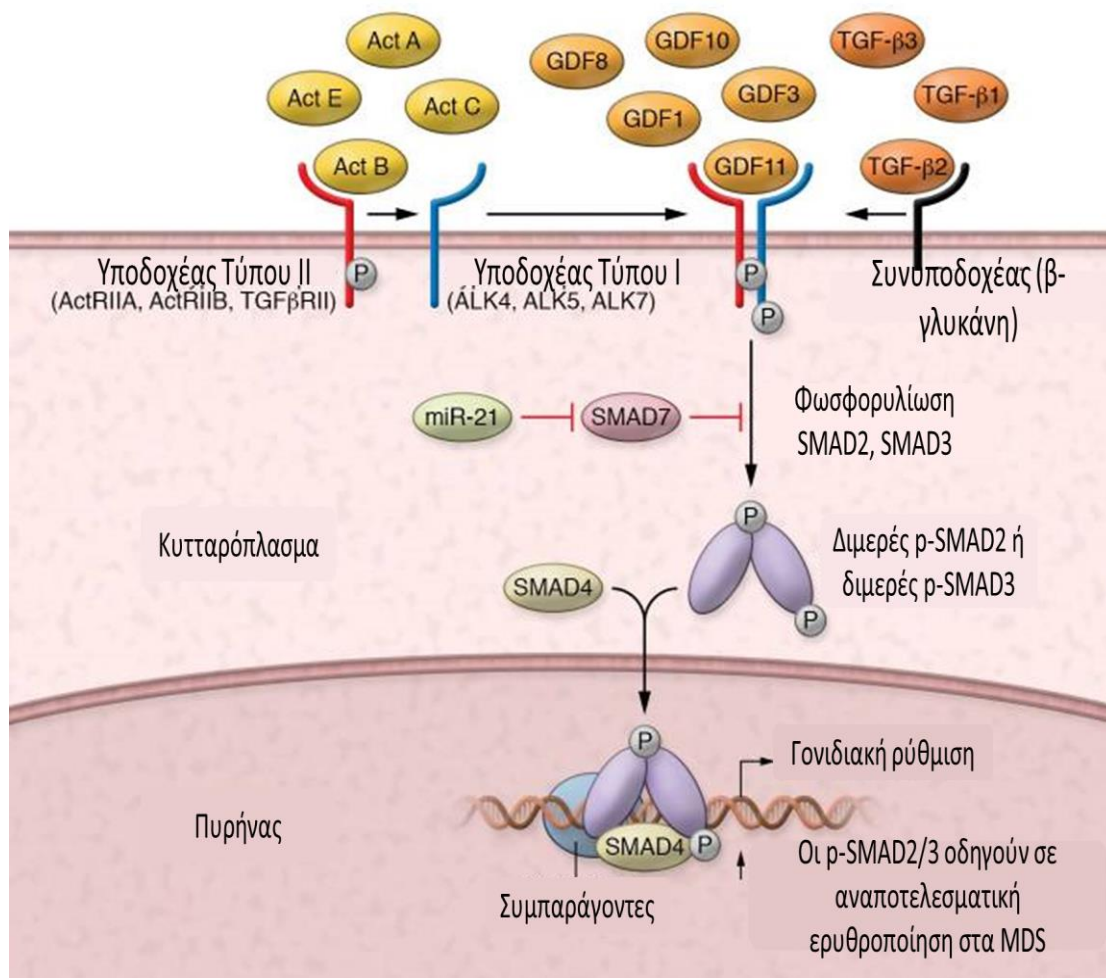


μελέτες με παγίδες συνδέτη υποδοχέα ακτιβίνης έχουν αποκαλύψει ότι άλλοι συνδέτες SMAD2/3 ρυθμίζουν την ωρίμανση των ερυθροειδών υπό κανονικές συνθήκες και συμβάλλουν στην απορυθμισμένη ωρίμανση των ερυθροειδών υπό παθολογικές συνθήκες. Μελέτες σε ποντίκια και ζέβρες εμπλέκουν τη σηματοδότηση SMAD1/5/8 σε συγκεκριμένες πτυχές της αιμοποίησης και της ερυθροποίησης. Οι ενεργοποιημένες (πρωτεΐνες SMAD που σχετίζονται με υποδοχείς) R-SMAD (receptor-associated SMAD) ασκούν τα αποτελέσματά τους στον πυρήνα σχηματίζοντας σύμπλοκα με μεταγραφικούς παράγοντες συγκεκριμένης θέσης και δεσμεύονται σε αλληλουχίες ενισχυτή ή υποστηρικτική στη ρυθμιστική περιοχή των γονιδίων-στόχων, ενεργοποιώντας ή καταστέλλοντας έτσι τη μεταγραφή. Οι ενεργοποιημένες R-SMAD ρυθμίζουν επίσης τη μεταγραφή στρατολογώντας συνενεργοποιητές και συν-καταστολείς που τροποποιούν τις ιστόνες και/ή τη δομή της χρωματίνης. (8)

Για να διερευνηθεί η μηχανιστική βάση για την υπερενεργοποίηση των (σηματοδοτών) SMAD2/3 στα MDS, εκτελέστηκε μια μεγάλη μετα-ανάλυση για να προσδιοριστεί εάν η έκφραση των γονιδίων της υπεροικογένειας TGF-β μπορεί να μεταβάλλεται σταθερά σε κύτταρα CD34+ (αρχέγονα και προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα) που προέρχονται από τον μυελό των ασθενών με MDS. Αυτή η ανάλυση αποκάλυψε ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης SMAD7, ενός σημαντικού ρυθμιστή αρνητικής ανάδρασης της σηματοδότησης της υπεροικογένειας, μειώνονται σημαντικά στα MDS σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς υγιείς μάρτυρες. Η SMAD7 μπορεί να συσχετιστεί με τον υποδοχέα τύπου I ALK5 και να εμπλέκεται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ ALK5 και SMAD2/3 (Εικόνα 3), ενεργώντας έτσι ως ενδογενές φρένο στη δραστηριότητα της οδού SMAD2/3 και η SMAD7 έχει βρεθεί ότι προάγει την αυτοανανέωση των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων στα κύτταρα *in vivo*. Μειωμένη έκφραση της SMAD7 επιβεβαιώθηκε σε αιμοποιητικά κύτταρα, οδηγώντας σε υπερενεργοποίηση της σηματοδότησης SMAD2 παρά τις χαμηλές συγκεντρώσεις του TGF-β. Ουσιαστικά, ο μικρομοριακός αναστολέας ALK5 LY-2157299 (galunisertib): (α) ανέστειλε την ενεργοποίηση του SMAD2 με τη μεσολάβηση του TGF-β και την αιμοποιητική καταστολή σε πρωτογενή αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα, (β) μετρίασε την αναιμία σε ένα διαγονιδιακό ποντίκι με μοντέλο

ανεπάρκειας στον μυελό των οστών, και (γ) διεγερμένη αιμοποίηση σε δείγματα μυελού των οστών από ασθενείς με MDS. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι τα βλαστοκύτταρα και/ή τα άλλα προγονικά κύτταρα σε ασθενείς με MDS παρουσιάζουν υπερενεργοποιημένη σηματοδότηση από τις SMAD2/3, που οφείλονται τουλάχιστον εν μέρει στα μειωμένα επίπεδα του SMAD7, και υποδεικνύουν περαιτέρω ότι αυτό το μονοπάτι θα μπορούσε να είναι ένας πιθανός στόχος για θεραπευτική παρέμβαση σε αναστολείς ALK5, όπως ως ο galunisertib. (8)

Σε μια άλλη μελέτη, επιδιώχθηκε να προσδιοριστεί η αιτία των μειωμένων επιπέδων της SMAD7 σε ασθενείς με MDS. Αυτή η μελέτη δεν βρήκε στοιχεία ότι οι ασθενείς με MDS διαθέτουν διαγραφή στον τόπο SMAD7 ή ανώμαλη μεθυλίωση του υποστηρικτή του. Ωστόσο, προσδιορίστηκε ότι η περιοχή 3'-UTR του γονιδίου SMAD7 περιέχει μια εξαιρετικά συντηρημένη, φερόμενη θέση δέσμωσης για το microRNA-21 (miR-21), ένα μόριο που αυξάνεται η ρύθμισή του σε πολλές ασθένειες και θεωρείται ως βασικός κλειδί στη φλεγμονώδη απόκριση. Τα επίπεδα του miR-21 ήταν αυξημένα σε δείγματα μυελού ασθενών με MDS (και οι δύο ομάδες χαμηλού και υψηλού κινδύνου) σε σύγκριση με τους μάρτυρες που ταιριάζουν στην ηλικία και το miR-21 φανερώθηκε ότι δεσμεύεται απευθείας στην περιοχή 3'-UTR της SMAD7 και μειώνει την έκφρασή της στα αιμοποιητικά κύτταρα. Τέλος, η θεραπεία με έναν χημικά τροποποιημένο αναστολέα του miR-21 αύξησε την έκφραση SMAD7 σε δείγματα ασθενών με MDS in vitro, αύξησε τον σχηματισμό ερυθροειδών αποικιών από πρωτογενείς προγόνους του μυελού των οστών MDS in vitro και αύξησε τον αριθμό των ερυθρών αιμοσφαιρίων σε ένα μοντέλο ποντικού με ανεπάρκεια μυελού των οστών από υπερέκφραση του TGF-β. Αυτά τα αποτελέσματα υπενίσσονται το miR-21 ως έναν ενδογενή ρυθμιστή των επιπέδων SMAD7, προάγοντας κατ' αυτόν τον τρόπο την υπερενεργοποίηση των SMAD2/3 και την αναποτελεσματική ερυθροποίηση στα MDS (Εικόνα 3). (8)



**Εικόνα 3.** Κανονική σηματοδότηση για SMAD 2/3-μονοπάτι συνδεδετών.

Τροποποιημένη από (8).

## 2.2 Η κυστιδοποίηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων στα Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα

Η κυστιδοποίηση της μεμβράνης των RBCs αυξάνεται σε πολλές αιματολογικές ασθένειες, συμπεριλαμβανομένων των κληρονομικών αιμολυτικών αναιμιών, μυελοδυσπλαστικών ή μυελοπολλαπλασιαστικών συνδρόμων και παροξυσμικής νυχτερινής αιμοσφαιρινουρίας (PNH- paroxysmal nocturnal hemoglobinuria), καθώς και σε μη αιματολογικές ασθένειες όπως η αθηροσκλήρωση και η καρδιαγγειακή νόσος, η νόσος Parkinson, ο διαβήτης (τύπου 2), η αποφρακτική άπνοια στον ύπνο

(Obstructing Sleep Apnoea – OSA), οι φλεγμονώδεις διαταραχές και η παρασιταμία της ελονοσίας, μεταξύ άλλων (Πίνακας 1). (9)

### Πίνακας 1.

Πηγή μικροκυστιδίων που προέρχονται από ερυθρά αιμοσφαίρια, μέθοδοι ανίχνευσης, ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά, ρόλος και συσχέτιση με την εξέλιξη/έναρξη/πρόγνωση νόσων .και πιθανή χρησιμότητα ως βιοδείκτες της νόσου.

#### Μικροκυστίδια (MVs) που προέρχονται από ερυθρά αιμοσφαίρια

Πηγή MVs	Μέθοδος απομόνωσης / χαρακτηρισμού	Φαινότυπος MVs	Λειτουργία/ Ρόλος	Νόσος	Επιδράσεις/ Σχέση με τη νόσο
Πλάσμα αίματος	Διαφοροποιημένη φυγοκέντρωση/ Κυτταρομετρία ροής	CD235 <sup>+</sup> PS <sup>+</sup> Συσσώρευση MVs	Ενεργοποίηση θρομβίνης, διαταραχή βιοδιαθεσιμότητας μονοξειδίου του αζώτου	Δρεπανοκυτταρική νόσος και ενδιάμεση Θαλασσαιμία	Πιθανό προθρομβωτικό σημάδι
Πλάσμα αίματος	Διαφοροποιημένη φυγοκέντρωση/ Κυτταρομετρία ροής	CD235a <sup>+</sup> PS <sup>+</sup> Συσσώρευση MVs	-	Μυελοπολλαπλασιαστικά νεοπλάσματα	-
Πλάσμα αίματος	Διαφοροποιημένη φυγοκέντρωση/ Κυτταρομετρία ροής	CD235a <sup>+</sup> Συσσώρευση MVs	Θετική συσχέτιση με τη δυσκαμψία της αορτής, την πίεση της πνευμονικής αρτηρίας και την ταχύτητα της τριγλώχινας παλινδρόμησης	Δρεπανοκυτταρική νόσος	Πιθανός βιοδείκτης για την αγγειακή δυσλειτουργία και τη σοβαρότητα της νόσου

Διεγερμένα RBCs με TSP-1, απομονωμένα από αίμα	Φυγοκέντρωση/ Κυτταρομετρία ροής	CD235a <sup>+</sup> PS <sup>+</sup> Συσώρευση MVs	Βλάβη ενδοθηλιακών κυττάρων, αγγειακή δυσλειτουργία, νεφρική αγγειοαπόφραξη	Δρεπανοκυτταρική νόσος (ποντίκια)	-
Πλάσμα αίματος	Διαφοροποιημένα φυγοκέντρωση/ Κυτταρομετρία ροής	CD235a <sup>+</sup> PS <sup>-</sup> και CD235a <sup>+</sup> CD59 <sup>-</sup> Συσώρευση MVs	Συμβολή που παρεμποδίζει την αιμόσταση και την θρόμβωση	Παροξυσμική νυχτερινή αιμοσφαιρινουρία	-
Πλάσμα αίματος	Διαφοροποιημένα φυγοκέντρωση/ Κυτταρομετρία ροής, Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης	CD235a <sup>+</sup> PS <sup>+</sup> Συσώρευση MVs	Θετική συσχέτιση με τη δραστηριότητα του ενζύμου G6PD	Ανεπάρκεια G6PD	Πιθανός βιοδείκτης σοβαρότητας ανεπάρκειας G6PD
Διεγερμένα RBCs, απομονωμένα από αίμα	Υπερφυγοκέντρωση/ AEN, Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης και HMM	CD235a <sup>+</sup> Συσώρευση MVs	Διατάραξη της ομοιόστασης του αγγειακού τόνου, επαγωγή υπέρτασης	Αποφρακτική άπνοια ύπνου	Σημάδι ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, Σοβαρότητα αποφρακτικής άπνοιας ύπνου
Πλάσμα αίματος	Διαφοροποιημένα φυγοκέντρωση/ Κυτταρομετρία ροής και HMM	CD235a <sup>+</sup> PS <sup>+</sup> Συσώρευση MVs	Συσχέτιση με αρκετές στεφανιαίες νόσους και ανεπιθύμητα κλινικά συμβάντα	Έμφραγμα του μυοκαρδίου	-
Ερυθρά αιμοσφαίρια	Διαφοροποιημένα	RMVs-που προέρχονται	Ανοσοτροποποιητικές	Λοίμωξη ελονοσίας	-

ρια μολυσμέ να με P. falciparu m (κυτταρι κές καλλιέργ ειες)	φυγοκέντρησ η, διήθηση, προστατευτικ ό σακχαρόζης 60%/ κυτταρομετρί α ροής, HMM και ανάλυση ανοσοαποτύπ ωσης	από RBCs μολυσμένα με ελονοσία	ιδιότητες, Διέγερση της ανάπτυξης του παρασίτου στο στάδιο της μετάδοσης		
RBCs μολυσμέ να με P. falciparu m (κυτταρι κές καλλιέργ ειες)	Διαφοροποιη μένη φυγοκέντρησ η/ Κυτταρομετρ ία ροής, PCR, Ανάλυση ανοσοαποτύπ ωσης	Σύμπλοκα MVs ερυθρών εμπλουτισμένα σε σύμπλοκα hAgo2-miRNA	Έμφυτη αντίσταση των RBCs στη μόλυνση από ελονοσία	Λοίμωξη ελονοσίας	Θεραπευτι κή δυνατότη α ως συστήμα α μεταβίβασ ης φαρμάκων
Πλάσμα αίματος	Διαφοροποιη μένη φυγοκέντρησ η/ Κυτταρομετρ ία ροής, HMM	TER-119 <sup>+</sup> Συσώρευση MVs	Καρδιοπροστα τευτικά αποτελέσματα	Ισχαιμική προϋπόθεση	-
Πλάσμα αίματος	Μέθοδος ανοσοσύλλη ψης/ AEN, ανάλυση ανοσοαποτύπ ωσης και HMM	Εμπλουτισμέν α σε α- συνουκλεΐνη CD235a+ MVs	Ταχεία διέλευση του αιματοεγκεφα λικού φραγμού	Νόσος του Πάρκινσον	Βιοδείκτη ς εξέλιξης ή έναρξης της νόσου
Πλάσμα αίματος	Διαφοροποιη μένη φυγοκέντρησ η/ Κυτταρομετρ ία ροής	PS+ CD235a+ Συσώρευση MVs	Συσχέτιση με υπερλιπιδαιμία	Μεταβολικό Σύνδρομο	-

RBCs, red blood cells, G6PD, Glucose-6-phosphate dehydrogenase-  
Αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης, NTA, Nanoparticle Tracking

Analysis- Ανάλυση Εντοπισμού Νανοσωματιδίων (AEN), RMVs-Μικροκυτίδια των ερυθρών, PCR, Polymerase Chain Reaction- αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, PS, phosphatidylserine- Φωσφατιδυλοσερίνη, TEM, Transmission Electron Microscopy-Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Μετάδοσης (HMM).

Τροποποίηση από (9).

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια δείχνουν επιταχυνόμενο ρυθμό κυστιδοποίησης σε αιματολογικές ασθένειες, όπως αιμολυτικές αναιμίες, μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα και PNH. Το οξειδωτικό στρες και η ενεργοποίηση του συμπληρώματος φαίνεται να είναι οι κύριοι παράγοντες προαγωγής, όπως αντανακλάται στην ενίσχυσή τους σε δείκτες οξείδωσης λιπιδίων και πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένης της οξειδωμένης αιμοσφαιρίνης, καταλάσης και υπεροξειδεδοξίνης-2, δηλαδή πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην ομοιόσταση της οξειδοαναγωγής. Ένας άλλος παράγοντας, τα αυξημένα επίπεδα της θρομβοσπονδίνης-1 στο πλάσμα φαίνεται να προκαλούν την αποβολή των μικροκυστιδίων των ερυθρών (RMVs) στην δρεπανοκυτταρική νόσο (Sickle cell disease-SCD) SCD, όπως παρατηρήθηκε από in vivo μελέτες. Τα παθολογικά αυξημένα επίπεδα της φωσφατιδυλοσερίνης (PS+) των RMVs έχουν θεωρηθεί ως προθρομβωτικός φαινότυπος σε αυτές τις παθολογίες. Σε αιμολυτικές διαταραχές που προκαλούνται από συμπλήρωμα, τα RMVs υποτίθεται ότι διεγείρουν τη δημιουργία θρομβίνης με τρόπο που εξαρτάται από τον παράγοντα F(VIII) και τον F(IX), ο οποίος (εκτός από την εξωτερίκευση της PS) συνδέεται στενά με την παρουσία ιόντων σιδήρου. Ένας άλλος μηχανισμός με τον οποίο τα RMVs συμβάλλουν σε θρομβωτικά περιστατικά, αγγειοδιαστολή/αγγειοσύσπαση και ενεργοποίηση του ενδοθηλίου στην PNH και σε άλλες ασθένειες σχετίζεται με τη ρύθμιση της βιοδιαθεσιμότητας του μονοξειδίου του αζώτου (NO) στο πλάσμα. Τα RMVs υποτίθεται ότι έχουν προοξειδωτική δράση στα ενδοθηλιακά κύτταρα (ECs) σε μυελοπολλαπλασιαστικά νεοπλάσματα (MPNs) και φάνηκαν ικανά να προκαλέσουν έκφραση μορίων προσκόλλησης και απελευθέρωση κυτταροκινών από ECs στη δρεπανοκυτταρική αναιμία (SCD), συμβάλλοντας σε αποφρακτικά περιστατικά και ενδοθηλιακή βλάβη. Από την άλλη πλευρά, τα αυξημένα επίπεδα έκθεσης της PS στα RMVs μπορεί να επηρεάσουν τη διάρκεια ζωής τους στην κυκλοφορία,

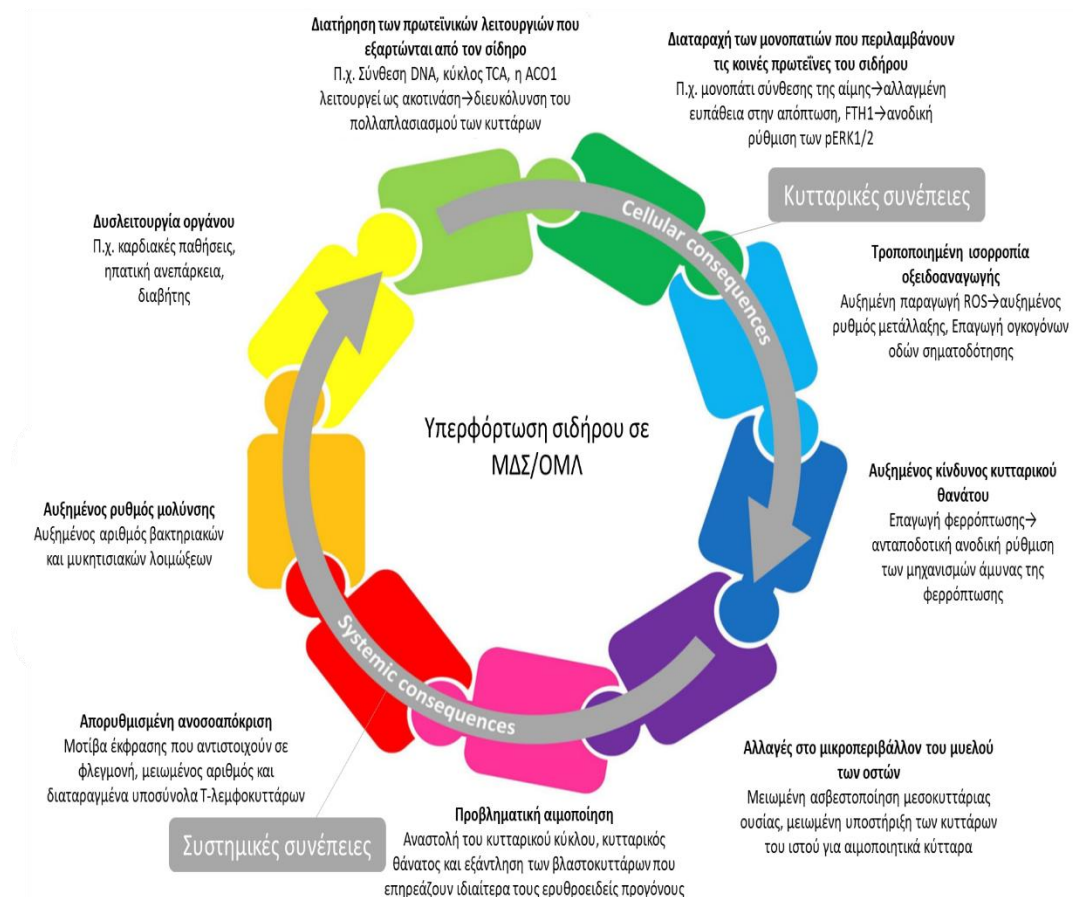
υποδηλώνοντας διαφορετική επίδραση στη θρομβογένεση, όπως έχει προταθεί για την PNH. Όσον αφορά τον ρόλο τους στην ομοίωση της πήξης, αντανάκλαται ξεκάθαρα σε αιμορραγικές διαταραχές όπως ορισμένα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα, τα οποία χαρακτηρίζονται από μειωμένα επίπεδα RMVs. Σχετικά με την χρησιμότητά τους ως βιοδείκτες σοβαρότητας της νόσου, έχει αποδειχθεί ότι τα επίπεδα RMVs έχουν θετικές συσχετίσεις με κλινικούς δείκτες της SCD (δηλαδή αποφρακτικά περιστατικά και αρτηκή σκληρότητα) καθώς και με την ενζυματική δραστηριότητα του G6PD σε ασθενείς με ανεπάρκεια G6PD. (9)

### 2.3 Ο σίδηρος στα Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα

Οι ασθενείς με MDS και Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία-ΟΜΛ (AML) μπορεί να αναπτύξουν πρωτογενή υπερφόρτωση σιδήρου που προκύπτει από ανεπαρκή ερυθροποίηση. Αλληπάλληλες μεταγγίσεις, οι οποίες στοχεύουν στη βελτίωση των συμπτωμάτων της αναιμίας, συχνά οδηγούν σε δευτερογενή υπερφόρτωση σιδήρου. Η υπερφόρτωση σιδήρου σε ασθενείς με MDS και AML μπορεί να οδηγήσει σε πολλαπλές κυτταρικές και συστημικές αλλαγές και επομένως παίζει καθοριστικό ρόλο σε αυτές τις αιματολογικές κακοήθειες (Εικόνα 4). Εκτός από τη σημασία του σιδήρου και των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του σιδήρου για πολλαπλές κυτταρικές λειτουργίες, ο σίδηρος είναι στενά συνδεδεμένος με την παραγωγή των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο όταν είναι σε υπέρβαση. Υπερφόρτωση σιδήρου στο μυελό των οστών και σε άλλους ιστούς μπορεί να οδηγήσει σε αλλοιώσεις του μικροπεριβάλλοντος και να συμβάλει σε αυξημένη νοσηρότητα. Από αυτή την άποψη, ο σίδηρος αποδείχθηκε ότι συμμετέχει στην επιδείνωση των συμπτωμάτων των ασθενών με MDS και ΟΜΛ (Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία) συμβάλλοντας στην κατάρρευση του μυελού των οστών. Η περίσσεια σιδήρου μπορεί επίσης να αλλάξει τα συστατικά του ανοσοποιητικού συστήματος και έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη ευαισθησία σε διάφορες λοιμώξεις. Επομένως, τα επίπεδα σιδήρου στον ορό και στα κύτταρα έχουν προγνωστική αξία κατά την αρχική διάγνωση, ενδέχεται να επηρεάσουν την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία και να προβλέψουν το



αποτέλεσμα μετά την μεταμόσχευση αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων (HSCT). Η συμμετοχή του σιδήρου σε διάφορες μεταβολικές διεργασίες και η ειδική αναγκαιότητά του για κακοήθη κύτταρα τον καθιστά ενδιαφέρον θεραπευτικό στόχο. (10)



**Εικόνα 4.** Επιπτώσεις υπερφόρτωσης σιδήρου.

Προσαρμοσμένη από (10).

Η αναποτελεσματική ερυθροποίηση και η σχετιζόμενη αναιμία είναι χαρακτηριστικά των αιματολογικών ασθενειών των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων (MDS) και της β-θαλασσαιμίας (β-θαλασσαιμία). Η διαχείριση της αναιμίας που σχετίζεται με αυτές τις ασθένειες συχνά απαιτεί συχνές και χρόνιες μεταγγίσεις RBCs. Ενώ οι μεταγγίσεις μπορεί να ανακουφίσουν τα συμπτώματα της αναιμίας, οι τακτικές μεταγγίσεις όχι μόνο ενέχουν μικρό κίνδυνο λοιμώξεων ή ανοσολογικών αντιδράσεων, αλλά συνδέονται επίσης με υπερφόρτωση σιδήρου, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε ηπατική ή καρδιακή βλάβη. (7)

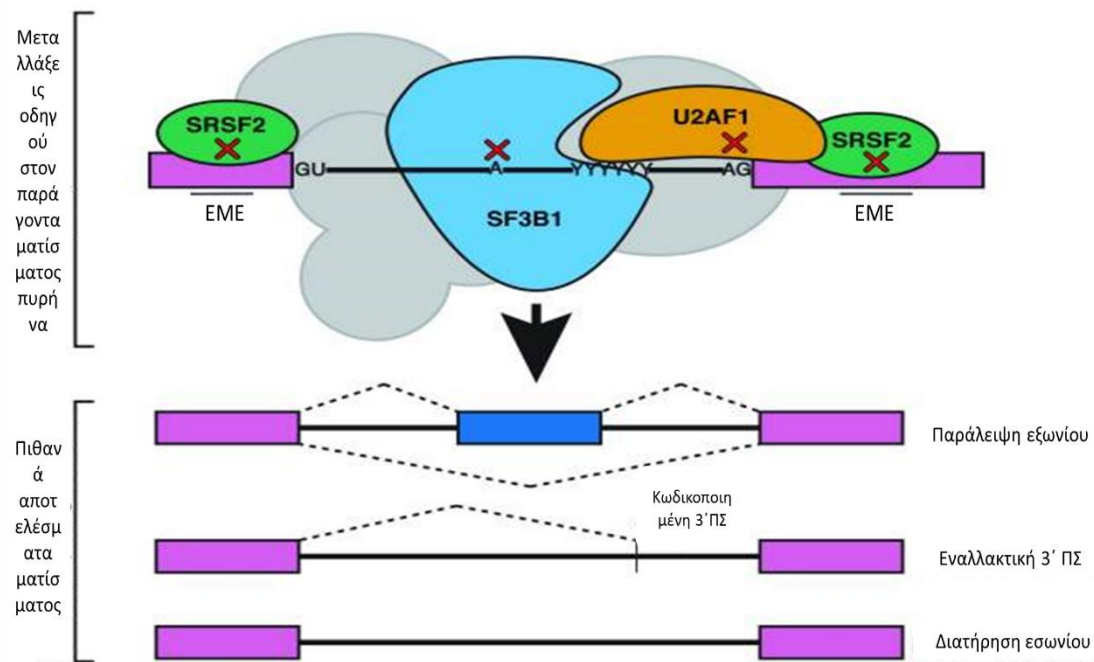
## 2.4 Το Οξειδωτικό στρες στην αιμοποιητική νησίδα

Το οξειδωτικό στρες δεν επηρεάζει μόνο τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα αλλά και το στρωματικό συστατικό της αιμοποιητικής νησίδας. Το μη φυσιολογικό μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών και η τροποποιημένη λειτουργία των μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων του μυελού των οστών έχουν εμπλακεί στην παθογένεση του MDS. Γενετικές ανωμαλίες, κυτταρική δυσλειτουργία και παραγωγή υψηλών επιπέδων φλεγμονωδών κυτταροκινών, συμπεριλαμβανομένων των TNF-α και IL-6, έχουν αναφερθεί σε στρωματικά κύτταρα που προέρχονται από τον μυελό των οστών ασθενών με MDS. Αυτό το αλλαγμένο μικροπεριβάλλον διαταράσσει την κανονική αιμοποίηση, οδηγώντας σε αυξημένη απόπτωση, ανώμαλη κυτταρική διαίρεση και δυσπλασία των προγονικών κυττάρων του μυελού των οστών. Ένα αλλαγμένο αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον έχει επίσης προταθεί ότι ευνοεί την επιλεκτική επέκταση του κλώνου MDS, συμβάλλοντας έτσι στην εξέλιξη της νόσου. (11)

Οι ROS (Δραστικές Μορφές Οξυγόνου) είναι σημαντικές για τον προσδιορισμό της τύχης των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων και εμπλέκονται σε φυσιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της σηματοδότησης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Ωστόσο, η συσσώρευση ROS στην αιμοποιητική θέση μπορεί να οδηγήσει σε επιτάχυνση της γήρανσης των HSC ή να προκαλέσει αιμοποιητικές κακοήθειες. Ο τρόπος οργάνωσης της αιμοποιητικής νησίδας εξακολουθεί να αποτελεί αντικείμενο έντονης έρευνας και η πρόσφατη πρόοδος έχει ανασκοπηθεί από τους Morrison και Scadden. Ένα από τα προτεινόμενα μοντέλα για την οργάνωση της αιμοποιητικής νησίδας υποδηλώνει ότι υπάρχει μια διαβάθμιση των επιπέδων οξυγόνου. Τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα και τα υποστηρικτικά μεσεγχυματικά κύτταρα της οστεοκλαστικής νησίδας που είναι σε κοντινή απόσταση από την επιφάνεια του ενδόστεου του οστού βρίσκονται κυρίως σε περιβάλλον χαμηλής περιεκτικότητας σε οξυγόνο, το οποίο εξασφαλίζει προστασία από τις ROS και την εξάντληση. Υπό αυτές τις συνθήκες, τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα παραμένουν σε αδράνεια. Αντίθετα, τα αιμοποιητικά κύτταρα που ενυπάρχουν στην πιο οξυγονωμένη νησίδα κοντά στην κυκλοφορία του αίματος πολλαπλασιάζονται ενεργά και διαφοροποιούνται. (11)

## 2.5 Μηχανισμοί ματίσματος στα Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα

Τα MDS χαρακτηρίζονται από αναποτελεσματική ερυθροποίηση και προδιάθεση για ανάπτυξη οξείας μυελογενούς λευχαιμίας παρά την ευρεία φαινοτυπική ετερογένεια. Πρόσφατα, επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις που σχετίζονται με τα MDS έχουν αναφερθεί στις πρωτεΐνες του πυρήνα του ματίσματος. Ενώ αυτές οι πρωτεΐνες μοιράζονται έναν φυσιολογικό ρόλο σε συναρμολόγηση mRNA, αυτά τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα MDS μπορούν να παράγουν ποικίλα αποτελέσματα σε ανώμαλο μάτισμα. Είναι πολύπλοκο να κατανοηθεί πώς οι μεταλλάξεις σε παράγοντες μάτισης πυρήνα, οι οποίοι πραγματοποιούν μάτισμα σε κάθε ιστό του σώματος, οδηγούν την κακοήθεια ειδικά στην γενεαλογία αίματος. Επιπλέον, είναι άγνωστο πώς αυτά τα νεομορφικά αλληλόμορφα παρέχουν πλεονέκτημα για τα μεταλλαγμένα κύτταρα προκειμένου να προωθηθεί η λευκογένεση. Τα αλληλόμορφα MDS είναι σε όλες τις περιπτώσεις αμοιβαία αποκλειόμενα μεταξύ των παραγόντων ματίσματος και ο προσβεβλημένος ιστός είναι πάντα ετερόζυγος. Οι πιο συχνά εμφανιζόμενες μεταλλάξεις παράγοντα ματίσματος που σχετίζονται με το MDS βρίσκονται στις πρωτεΐνες SF3B1, U2AF και SRSF2 (Εικόνα 5). Μεταλλάξεις εντοπίζονται λιγότερο συχνά και σε άλλους παράγοντες μάτισης (ZRSR2, U2ASF65, PRP40B και SF1). Τα αλληλόμορφα MDS προκαλούν μη επικαλυπτόμενα μοτίβα εναλλακτικού ματίσματος, υποδηλώνοντας ότι ένας πολύπλοκος μηχανισμός ανώμαλου ματίσματος προάγει το MDS ή αλλιώς ότι προάγεται η εξέλιξη της νόσου από εναλλακτικές δραστηριότητες αυτών των πρωτεϊνών που δεσμεύουν το RNA που δεν σχετίζονται με το μάτισμα. (12)



**Εικόνα 5.** Οι μεταλλάξεις οδηγού στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα εισάγουν αλλαγές μεμονωμένων αμινοξέων στους παράγοντες ματίσματος του πυρήνα. Σωματικές μεταλλάξεις σε γενικούς παράγοντες μάτισης U2AF1, SRSF2 και SF3B1 έχουν εμπλακεί σε μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα. Αν και αυτές οι πρωτεΐνες εμπλέκονται στην αναγνώριση των αλληλουχιών θέσεων ματίσματος σε όλα τα pre-mRNAs, ελαττώματα ματίσματος ειδικών ιστών παρατηρούνται στα αιμοσφαίρια. Αυτές οι μεταλλάξεις οδηγούν σε ανώμαλο μάτισμα σε ερυθροβλάστες σε ένα ευρύ φάσμα μεταγραφών. ESE, exonic splicing enhancer-ενισχυτής ματίσματος εξωνίου (EME), SS, splice site- περιοχή συρραφής (ΠΣ).

Τροποποίηση από (12).

## 2.6 Η διάγνωση των Μυελοδυσπλαστικών Συνδρόμων

Οι ασθενείς συχνά παρουσιάζουν συμπτώματα αναιμίας ή αιμορραγίας ή τυχαία μη φυσιολογικά αποτελέσματα της γενικής εξέτασης αίματος ρουτίνας (Πίνακας 2). Μια αρχική διαφορική διαγνωστική αξιολόγηση για τον αποκλεισμό ελλείψεων σιδήρου, βιταμίνης B12 και φυλλικού οξέος, καθώς και αιμόλυση, μεταξύ άλλων, θα πρέπει να ακολουθείται από ειδικές αιματολογικές εξετάσεις. Μια κανονική γενική αίματος ρουτίνας διαφοροποιημένη καθιστά απίθανη τη νόσο των βλαστικών κυττάρων του

μυελού των οστών. Η νόσος των βλαστοκυττάρων του μυελού των οστών πρέπει να θεωρείται ιδιαίτερα σε ασθενείς με δι- ή πανκυτταροπενία. Εκτός από τις ανεπάρκειες αναιμίες και την αιμόλυση, οι βασικές διαφορικές διαγνώσεις περιλαμβάνουν τοξική βλάβη του μυελού των οστών, ανοσο-μεσολαβούμενη κυτταροπενία (άνοση θρομβοπενία/αιμόλυση), απλαστική αναιμία, κληρονομικές ασθένειες του μυελού των οστών, παροξυσμική νυχτερινή αιμοσφαιρινουρία, αλλά και οξεία μυελοειδής αναιμία. Είναι σημαντικό να λαμβάνεται υπόψη η προηγούμενη έκθεση σε μεταλλαξιογόνους παράγοντες, όπως η χημειοθεραπεία, η ακτινοθεραπεία και η θεραπεία με ραδιενεργό ιώδιο, καθώς αυτοί αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης βλαστικών κυττάρων. Περίπου το 10% των ασθενών έχουν MDS που σχετίζεται με τη θεραπεία. Είναι σημαντικό να λαμβάνεται υπόψη το επαγγελματικό ιστορικό, ειδικά σε ηλικιωμένους ασθενείς, διότι στην περίπτωση έκθεσης σε βενζόλιο, για παράδειγμα ως ελαιοχρωματιστής ή συνοδός αντλίας βενζίνης, το MDS μπορεί να θεωρηθεί ως επαγγελματική ασθένεια. Το πρώτο βήμα θα πρέπει να είναι μια μικροσκοπική εξέταση του αίματος για την αξιολόγηση της μορφολογίας των μονοκυττάρων, καθώς σημεία κοκκιοκυτταρικής δυσπλασίας, όπως η υποκοκκίωση ή τα ψευδο-κύτταρα Pelger-Huët, μπορεί να είναι ενδεικτικά MDS. Η κυτταρολογία του μυελού των οστών και η ιστολογία του μυελού των οστών είναι υποχρεωτική. Η κυτταρολογία του μυελού των οστών εξ ορισμού δείχνει τουλάχιστον 10% κύτταρα με μειωμένη διαφοροποίηση/ωρίμανση σε μία, αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις δύο ή και στις τρεις μυελοειδείς κυτταρικές σειρές. Χρωμοσωμική ανάλυση απαιτείται για διαγνωστικούς και προγνωστικούς λόγους.

(13)

## **Πίνακας 2.** Στοιχεία για την διάγνωση Μυελοδυσπλαστικών Συνδρόμων

Τροποποίηση από (13).

ΠΙΝΑΚΑΣ 2

## Διάγνωση Μυελοδυσπλαστικών Συνδρόμων/ Νεοπλασμάτων

### Περιφερικό αίμα (υποχρεωτικό)

- Αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων: πιθανώς <4.000/ μL
- Αριθμός αιμοπεταλίων: πιθανώς <100.000/ μL
- Αιμοσφαιρίνη, σχεδόν πάντα <12 g/dL στις γυναίκες, <13,5 g/dL στους άνδρες
- Αριθμός δικτυοερυθροκυττάρων: συνήθως αλλά όχι πάντα μειωμένος
- Χειροκίνητη διαφοροποιημένη γενική εξέταση αίματος (αριθμός ουδετερόφιλων κοκκιοκυττάρων, ενδείξεις δυσπλασίας, ποσοστό βλαστών)
- LDH U/L (επίπεδα πάνω από το φυσιολογικό είναι ενδεικτικά μίας δυσμενούς πρόγνωσης)
- Φερριτίνη μg/L, πιθανώς ανεβασμένη
- Επίπεδο ερυθροποιητίνης, συχνά αυξημένο
- Ομάδα αίματος, σε περίπτωση που απαιτηθούν μεταγγίσεις
- Μη υποχρεωτικό: Τυποποίηση HLA και κατάσταση CMV (κυτταρομεγαλοϊού), εάν πληρούνται οι προϋποθέσεις για αλλογενής μεταμόσχευση βλαστοκυττάρων
- Μη υποχρεωτικό: έκφραση WT1 (εάν >50 ενδεικτικό κακής πρόγνωσης)

### Μυελός των Οστών (υποχρεωτικό)

- Κυτταρολογία με χρώση για σίδηρο, ιούς POX και χρώση για εστεράση (έκταση δυσπλασίας, ποσοστό βλαστών)
- Ιστολογία βιοψίας από οστεοτρύπανο (κυτταρική, ίνωση)
- Χρωμοσωμική ανάλυση με ανάλυση 25 μεταφάσεων (χρωμοσωμικές μετατοπίσεις): συμπληρώνεται από FISH, σε μεμονωμένες περιπτώσεις
- Αναλύσεις μετάλλαξης (σημαντικά γονίδια: TP53, MLL, ETV6, IDH2, CBL, SF3B1, JAK2, ASXL1, RUNX1, SRSF2, U2AF1, DNMT3A, ZRSE2, EZH2, NRAS, KRAS, PDGF-a/b)
- Μη υποχρεωτικό: ανοσοφαινοτυποποίηση

FISH (fluorescence in situ hybridization): υβριδισμός φθορισμού in situ, HLA (human leukocyte antigen): ανθρώπινο λευκοκυτταρικό αντιγόνο, LDH (lactate dehydrogenase): γαλακτική αφυδρογονάση, WT1 (Wilms' tumor 1): όγκος του Wilms 1

Η ακριβής διάγνωση του MDS απαιτεί υλικό υψηλής ποιότητας για μορφολογική ανάλυση, συμπεριλαμβανομένης της ανασκόπησης ενός περιφερειακού επιχρίσματος αίματος (PB), μία αναρρόφηση αντιπροσωπευτικού μυελού των οστών (καθώς και μια κηλίδα σιδήρου στο επίχρισμα αναρρόφησης), και επαρκή βιοψία μυελού των οστών. Ο διαγνωστικός ιατρός πρέπει επίσης να έχει πρόσβαση στα αποτελέσματα των βοηθητικών δοκιμών, συμπεριλαμβάνοντας έναν πλήρη συμβατικό καρυότυπο του μυελού των οστών, σχετικό μοριακό γενετικό έλεγχο, κυτταρομετρίας ροής με ανοσοφαινοτυποποίηση, και τιμές περιφερικού αίματος, καθώς και άλλες κλινικές πληροφορίες όπως οποιαδήποτε προηγούμενη έκθεση σε κυτταροτοξικές θεραπείες. Οι τρεις «πυλώνες» που υποστηρίζουν τη διάγνωση MDS είναι: 1. επίμονη και κλινικά ανεξήγητη κυτταροπενία (απαραίτητη προϋπόθεση). 2. σημαντική μορφολογική δυσπλασία των αιμοποιητικών στοιχείων (με εξαίρεση τις περιπτώσεις που έχουν ορισμένες χαρακτηριστικές κυτταρογενετικές ανωμαλίες). και 3. κυτταρογενετικά και/ή μοριακά γενετικά στοιχεία κλωνικής αιμοποίησης (δεν απαιτούνται, αλλά είναι χρήσιμες συμπληρωματικές πληροφορίες). Εκτός από την καθιέρωση μιας πρωτογενούς διάγνωσης του MDS, μια λεπτομερής αξιολόγηση της μορφολογίας του αίματος και του μυελού των οστών είναι απαραίτητη για την ταξινόμηση της νόσου και παρέχει κρίσιμες πληροφορίες για τη διαστρωμάτωση του κινδύνου των ασθενών. Ένα ακριβές ποσοστό μυελοβλαστών στο αίμα και στο μυελό των οστών είναι ιδιαίτερα σημαντικό. Η κυτταρομετρίας ροής με ανοσοφαινοτυποποίηση μπορεί να είναι χρήσιμη για την υποστήριξη της διάγνωσης του MDS. Η κυτταρογενετική αξιολόγηση για την κυτταρογενετική ανωμαλία της έλλειψη του μεγάλου βραχίονα του 5<sup>ου</sup> χρωμοσώματος-del(5q) επηρεάζει την

ταξινόμηση των MDS και ο συνολικός καρυότυπος έχει σημαντική προγνωστική αξία που χρησιμοποιείται για τη διαστρωμάτωση του κινδύνου των ασθενών και τελικά επηρεάζει τις θεραπευτικές προσεγγίσεις σε μεμονωμένους ασθενείς. Ένας πλήρης καρυότυπος του μυελού των οστών πρέπει να αποστέλλεται κάθε φορά που λαμβάνεται δείγμα μυελού των οστών για ύποπτο MDS. Τέλος, λόγω των ραγδαίων πρόσφατων προόδων στην αλληλούχιση νέας γενιάς (NGS), υπήρξε μία μαζική εισροή δεδομένων σχετικά με τη σημασία των μεταλλάξεων στη διάγνωση και την πρόγνωση του MDS. Αν και η ταξινόμηση του 2016 ενσωματώνει πλέον τη χρήση μιας μοναδικής μετάλλαξης, SF3B1, στον ορισμό ενός μοναδικού υποτύπου MDS, του MDS με σιδηροβλάστες δακτυλίου, υπάρχουν ακόμα αρκετές προκλήσεις κατά την εφαρμογή δεδομένων μετάλλαξης NGS σε μια διάγνωση. Πολλές σωματικές μεταλλάξεις που σχετίζονται με μυελοειδή έχουν εντοπιστεί σε φυσιολογικά υγιή ηλικιωμένα άτομα και μπορεί να είναι δύσκολο να προσδιοριστεί εάν έχει εντοπιστεί μετάλλαξη που υποδηλώνει MDS ή είναι τυχαίο εύρημα στον πληθυσμό ηλικιωμένων ασθενών που συνήθως επηρεάζεται από MDS. Καθώς συσσωρεύονται πρόσθετα δεδομένα, συγκεκριμένα μοτίβα μετάλλαξης μπορεί, στο μέλλον, να βοηθήσουν στην καθιέρωση μιας πρωτογενούς διάγνωσης του MDS σε κυτταροπενικούς ασθενείς, την στιγμή που συγκεκριμένες κυτταρογενετικές ανωμαλίες προκαλούνται αυτή τη στιγμή. (14)

Η διάγνωση του MDS βασίζεται στην ποσοτική και ποιοτική αξιολόγηση της κυτταρολογικής σύνθεσης του περιφερικού αίματος (PB) και του Μυελού των Οστών (BM), χρησιμοποιώντας βασικές αιματολογικές τεχνικές, όπως αιμοκυτταρομετρία, οπτική μικροσκόπηση σε φιλμ του PB και του BM, σταθεροποιημένα και χρωματισμένα με πανοπτικές χρώσεις και κυτταροχημεία για την ανίχνευση σιδήρου στον BM. Η παρουσία τουλάχιστον μίας κυτταροπενίας αποτελεί "απαραίτητη προϋπόθεση" για οποιαδήποτε διάγνωση MDS. Τα κατώτατα όρια είναι αιμοσφαιρίνη <10 g/dL, αιμοπετάλια <100×10<sup>9</sup>/L και απόλυτος αριθμός ουδετερόφιλων (Absolute neutrophil count-ANC) <1,8×10<sup>9</sup>/L. Τα μονοκύτταρα του PB πρέπει να είναι μικρότερα από 1×10<sup>9</sup>/L. Διαφορετικές πιθανές διαταραχές θα πρέπει να αποκλείονται επακριβώς ως πρωτογενείς αιτιολογίες κυτταροπενίας. Η κυτταροπενία θα πρέπει να είναι σταθερή για ≥ έξι μήνες, εκτός εάν σχετίζεται με



συγκεκριμένο καρυότυπο ή δυσπλασία διπλής γενεαλογικής σειράς, στην οποία περίπτωση απαιτούνται μόνο δύο μήνες σταθερής κυτταροπενίας. Πρέπει να σημειωθεί ότι ορισμένες εθνοτικές ομάδες μπορεί να έχουν εύρος αναφοράς ANC  $<1,8 \times 10^9/L$ . Θα πρέπει να δίνεται προσοχή στην ερμηνεία της ουδετεροπενίας, εάν είναι η μόνη κυτταροπενία. (15)

### 2.7 Το Μυελοδυσπλαστικό Σύνδρομο-Δακτυλιοειδών Σιδηροβλαστών

Το MDS-RS-Ring Sideroblasts (MDS-ΔΣ-Δακτυλιοειδών Σιδηροβλαστών) είναι συνήθως ένα MDS χαμηλότερου κινδύνου που χαρακτηρίζεται από αναιμία, μορφολογική δυσπλασία που εμπεριέχει μία ή περισσότερες γενεαλογικές σειρές και περιλαμβάνει Δακτυλιοειδείς Σιδηροβλάστες του Μυελού των Οστών-MO (BM RS) σε ποσοστό  $\geq 15\%$  των προγονικών ερυθροειδών του MO (σε ποσοστό  $\geq 5\%$  παρουσία μεταλλάξεων στην SF3B1). Προκειμένου να πληρούν τα διαγνωστικά κριτήρια του ΠΟΥ του 2016, η περιεκτικότητα σε μυελοβλάστες του MO (BM) θα πρέπει να είναι  $<5\%$ , η περιεκτικότητα σε βλάστες περιφερικού αίματος (PB)  $<1\%$ , μαζί με την απουσία ράβδων Auer, την έλλειψη διαγνωστικών κριτηρίων για MDS με απομονωμένη την έλλειψη μακρών σκελών του χρωμοσώματος 5 (del-5q) και τον αποκλεισμό των δευτερογενών αιτιών των RS. Το MDS-RS υπο-ταξινομείται περαιτέρω σε δύο ομάδες: το MDS-RS με δυσπλασία μονής γραμμής γενεαλογίας (SLD, πρώην RARS) και το MDS-RS με δυσπλασία πολλαπλών γενεαλογιών (MLD, πρώην RCMD-RS). Το MDS-RS-SLD αποτελεί περίπου το 3–10% όλων των περιπτώσεων MDS και έχει διάμεση ηλικία εμφάνισης τα 71 έτη, με μία ελαφρά ανδρική υπεροχή. Κλωνικές κυτταρογενετικές αλλαγές μπορούν να παρατηρηθούν στο 5-20% των περιπτώσεων και όταν υπάρχουν συνήθως αφορούν ένα μόνο χρωμόσωμα. (16)

Το MDS-RS-MLD χαρακτηρίζεται από δικυτταροπενία ή πανκυτταροπενία και δυσπλασία που επηρεάζει σε ποσοστό  $>10\%$  των κυττάρων σε δύο ή περισσότερες γενεαλογικές σειρές μυελοειδών κυττάρων. Παραδοσιακά, αυτοί οι ασθενείς θεωρούνταν ότι είχαν μικρότερη συνολική επιβίωση (Overall Survival-OS) με υψηλότερο κίνδυνο για λευχαιμική μεταμόρφωση (leukemic transformation-LT), σε σύγκριση με ασθενείς με MDS-RS-SLD. (16)

Στους ασθενείς με MDS, εκείνοι με MDS-RS έχουν σχετικά νωθρή νόσο. Η συντριπτική πλειονότητα αυτών των ασθενών φέρει μια σωματική μετάλλαξη οδηγού στο γονίδιο του σωματίου συρραφής SF3B1. Σε αυτή την κατάσταση, τα αιμοποιητικά κύτταρα είναι ετερόζυγα για τη μετάλλαξη SF3B1, έτσι ώστε το κυτταρόπλασμά τους να περιέχει περίπου ίσες αναλογίες φυσιολογικών και μεταλλαγμένων παραγόντων ματίσματος SF3B1. Τα σωματίδια συρραφής με μεταλλαγμένο παράγοντα ματίσματος SF3B1 χρησιμοποιούν κατά προτίμηση τις 3' κωδικοποιημένες θέσεις ματίσματος, τα οποία οδηγούν σε μεσολαβούμενη αποσύνθεση των πολλαπλών λανθασμένων μεταγραφών ή τη δημιουργία ισομορφών εντός του πλαισίου. Μέσα στα απορυθμισμένα γονίδια είναι το ABCB7 και το TMEM14C, των οποίων η συντονισμένη ανεπάρκεια παίζει καθοριστικό ρόλο στον σχηματισμό των σιδηροβλαστών δακτυλίου. Επιπλέον, η απορρύθμιση του SEPTIN2 αποδείχθηκε ότι συμβάλλει στην ελαττωματική ωρίμανση των ερυθροειδών. (17)

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της ωσμωτικής αντίστασης των ερυθροκυττάρων σε ασθενείς με Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα (MDS).

Για την επίτευξη της συγκεκριμένης έρευνας συγκεντρώθηκαν 29 δείγματα ασθενών διαγνωσμένων με MDS και 18 δείγματα υγιών ατόμων, όπου και οι δύο ομάδες είχαν το ίδιο ηλικιακό εύρος. Πιο αναλυτικά το εύρος όλων των ατόμων που εξετάστηκαν ήταν από 64 έως 96 έτη λόγω της αυξημένης συχνότητας εμφάνισης της ασθένειας των MDS στις μεγαλύτερες ηλικίες.

Η συγκεκριμένη ερευνητική διπλωματική εργασία αναφέρεται στην ευαισθησία των ερυθροκυττάρων στην αιμόλυση μέσω της διάμεσης τιμής της ωσμωτικής ευθραυστότητας (median corpuscular fragility-MCF). Με την MCF εκφράζεται η συγκέντρωση του NaCl που προκαλεί την λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων σε ποσοστό 50%. Επομένως στην συνέχεια θα γίνει σύγκριση της μέσης τιμής της MCF των ασθενών με MDS και της μέσης τιμής της MCF των υγιών ατόμων (controls). Επιπλέον θα μελετηθεί και η διαφορά της MCF όταν υπολογίζεται σε θερμοκρασία δωματίου του εργαστηριακού χώρου κι όταν υπολογίζεται έπειτα από επώαση 24 ωρών στους 37°C.

Το τεστ ωσμωτικής ευθραυστότητας (Osmotic Fragility Test-OFT) χρησιμοποιείται συμβατικά για την αξιολόγηση της αντίστασης των ερυθροκυττάρων στην αιμόλυση, βοηθώντας έτσι στη διάγνωση αρκετών διαταραχών των ερυθροκυττάρων, όπως η αιμολυτική αναιμία, η κληρονομική σφαιροκυττάρωση, η ελλειπτοκυττάρωση και η θαλασσαιμία. Εισήχθη αρχικά σε κλινικά εργαστήρια από τον Dacie το 1954. Το OFT αναλύει την αιμόλυση των ερυθροκυττάρων χρησιμοποιώντας μια σειρά υποτονικών διαλυμάτων χλωριούχου νατρίου (NaCl). Το 1980, ο Zanella et al. εισήγαγαν μια τροποποιημένη έκδοση της κλασικής μεθόδου Dacie, προσθέτοντας γλυκερόλη σε ισοτονικό αλατούχο διάλυμα ρυθμισμένο με φωσφορικά (στην παρούσα μελέτη δεν χρησιμοποιήθηκε αυτή η μέθοδος αλλά μια σειρά υπότονων και ισότονων

διαλυμάτων χλωριούχου νατρίου-NaCl). Το μήκος κύματος φως που χρησιμοποιείται συνήθως για τη μέτρηση είναι 540 nm, με μόνο την αιμοσφαιρίνη (ως την κύρια πρωτεΐνη των ερυθροκυττάρων) να συμβάλλει στην απορρόφηση. Η ωσμωτική ευθραυστότητα των ερυθροκυττάρων στη συνέχεια ορίζεται από μετατοπίσεις στην καμπύλη αιμόλυσης, συσχετίζοντας την απορρόφηση φως και τη συγκέντρωση NaCl. (18)

Το OFT είναι ουσιαστικά μια χειροκίνητη, επίπονη και χρονοβόρα ανάλυση, επομένως δεν μπορεί να εκτελείται καθημερινά στα περισσότερα κλινικά εργαστήρια. Επομένως τα δείγματα ολικού αίματος μπορούν να αποθηκευτούν για ημέρες πριν από την εξέταση. Αρκετές πηγές αποδεικτικών στοιχείων καταδεικνύουν τώρα ότι τα περισσότερα εργαστηριακά σφάλματα προκύπτουν στην προαναλυτική φάση, κυρίως λόγω της έλλειψης τυποποιημένων διαδικασιών συλλογής δειγμάτων (δηλαδή μεταφορά, χειρισμός και προετοιμασία πριν από την εξέταση) και της αποθήκευσης. Σε ορισμένους τομείς εξετάσεων, όπως η εργαστηριακή αιματολογία, οι συνέπειες των σφαλμάτων μπορεί συχνά να είναι σοβαρές, ειδικά αυτές που σχετίζονται με εξειδικευμένες διαγνωστικές εξετάσεις, καθώς μπορεί να οδηγήσουν στη δημιουργία ψευδώς θετικών ή αρνητικών αποτελεσμάτων των εξετάσεων και λανθασμένη διάγνωση, θέτοντας έτσι σε κίνδυνο την ασφάλεια των ασθενών και δημιουργώντας μία σταδιακά αυξανόμενη δαπάνη που μπορεί να αποφευχθεί για το σύστημα υγειονομικής περίθαλψης. Οι κλινικές συνέπειες των εργαστηριακών σφαλμάτων μπορεί να είναι επιζήμιες επειδή μπορεί να συμβάλουν στη διακοπή τόσο των κλινικών όσο και των θεραπευτικών αποφάσεων. Σύμφωνα με το έγγραφο του Διεθνούς Οργανισμού Προτύπων (ISO) 15189:2012, τα ιατρικά εργαστήρια πρέπει πάντα να επαληθεύουν τη σταθερότητα του δείγματος αίματος και να αξιολογούν την πιθανή επίδραση μερικών προαναλυτικών μεταβλητών (δηλαδή, χρόνος και θερμοκρασία αποθήκευσης πριν από τις αναλύσεις). Όσον αφορά το OFT, αυτή η εξέταση μπορεί να επηρεαστεί από διάφορες προαναλυτικές μεταβλητές που σχετίζονται με τον αναερόβιο μεταβολισμό των ερυθροκυττάρων. (18)

Μία απλούστερη και φθηνότερη μέθοδος, που χρησιμοποιείται σε περιοχές όπου οι πόροι είναι περιορισμένοι, είναι να ανιχνευτούν τα κύτταρα με χαμηλούς δείκτες ερυθρών αιμοσφαιρίων χρησιμοποιώντας την εξέταση ωσμωτικής ευθραυστότητας

ενός σωλήνα ή ΟΤΟFT (one tube osmotic fragility test). Η ωσμωτική ευθραυστότητα ενός ερυθροκυττάρου σχετίζεται με το μέγεθος και το σχήμα του: όσο μικρότερο είναι το κύτταρο, τόσο πιο ανθεκτικό θα πρέπει να είναι. Ομοίως, η χαμηλή κυτταρική αιμοσφαιρίνη μπορεί επίσης να συνδέεται με αύξηση της ωσμωτικής αντίστασης. Για την εκτέλεση του ΟΤΟFT, μια σταγόνα αίματος τοποθετείται σε ένα σωλήνα που περιέχει ρυθμισμένο διάλυμα NaCl (συνήθως 0,36% NaCl) ή αλατούχο διάλυμα γλυκερίνης. Ο σωλήνας αφήνεται να σταθεί και στη συνέχεια ο βαθμός λύσης εκτιμάται φωτομετρικά ή με οπτική επιθεώρηση. Στην τελευταία περίπτωση το τεστ είναι γνωστό ως Naked Eye Single Tube Red cell Osmotic Fragility Test ή NESTROFT. Εάν η λύση είναι κάτω από ένα ορισμένο επίπεδο, το δείγμα θεωρείται μικροκυτταρικό και θα πρέπει να παραπεμφθεί για περαιτέρω έλεγχο. (19)

## 3.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 3.2.1 Υπολογισμός απορρόφησης ερυθρών αιμοσφαιρίων σε διάλυμα NaCl

#### Αρχή μεθόδου

Η λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και η απελευθέρωση της αιμοσφαιρίνης στο εκάστοτε διάλυμα χλωριούχου νατρίου (NaCl) βασίζεται στο φαινόμενο της ώσμωσης. Για αυτόν τον λόγο κατασκευάζονται υπότονα διαλύματα NaCl με υπερκάθαρο νερό-WFI (Water For Injection) από 0-0,7% (συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα NaCl 0%, 0,3% 0,35% 0,4% 0,45% 0,5% 0,55% 0,6% 0,7% 0,9%) και ένα ισότονο διάλυμα NaCl 0,9%. Η μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων στο κάθε διάλυμα NaCl υποδηλώνει τον βαθμό της λύσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Όσο πιο μεγάλη είναι η απορρόφηση τόσο περισσότερο έχουν αιμολυθεί τα RBCs. Στη συνέχεια κατασκευάζεται μέσω του προγράμματος MS Excel η καμπύλη της MCF.

#### Υλικά-αντιδραστήρια-σκεύη-όργανα

- Λυοφιλοποιημένο NaCl
- Αναλυτικός ζυγός
- Μαγνήτες ανάδευσης

- Κωνική φιάλη του ενός 1 λίτρου (1 L)
- Ποτήρια ζέσεως
- Ογκομετρικές φιάλες
- Πιπέτες Pasteur
- Μικροπιπέτες
- Φασματοφωτόμετρο
- Φυγόκεντρος
- Μηχανικός αναδευτήρας
- Ρότορας
- Υδατόλουτρο
- Υπερκάθαρο νερό-WFI
- Στατώ
- Σωληνάρια Eppendorfs

### Πειραματική διαδικασία

1. Προσθήκη 2,0 mL (= 2.000  $\mu$ L) του εκάστοτε διαλύματος NaCl (π.χ. 0% NaCl, 0,3% NaCl, κλπ.) στο αντίστοιχο σωληνάριο που έχουμε σημειώσει
2. Προσθήκη 20  $\mu$ L ολικού αίματος σε κάθε σωληνάριο
3. Ανάδευση σε μηχανικό αναδευτήρα για ένα δευτερόλεπτο (sec).
4. Γίνεται επώαση 15' λεπτών (mins) σε Room Temperature (θερμοκρασία δωματίου)
5. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1.500 στροφές για 5' λεπτά (mins)
6. Πραγματοποιείται φωτομέτρηση στα 540 nm

Ακολουθούν παραδείγματα για τον ασθενή MDS-22:

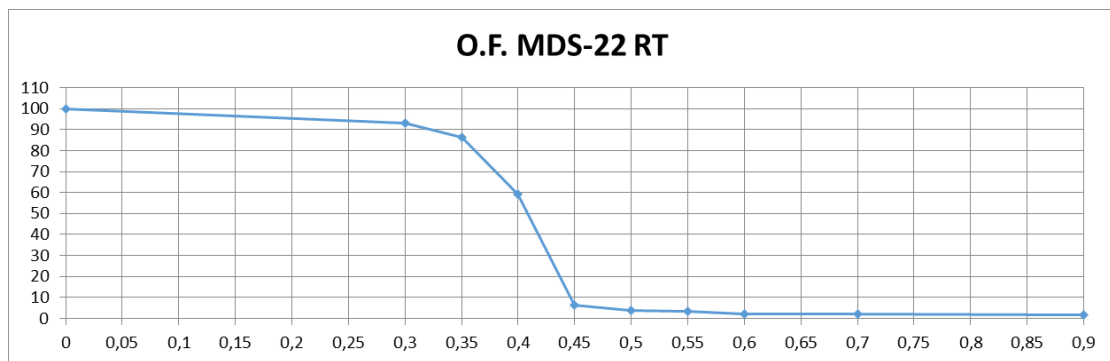
### **Πίνακας 3.**

Πίνακας τιμών για τον ασθενή με κωδική ονομασία MDS-22										
Διάλυμα α (δ/μα) NaCl%	0	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5	0,55	0,6	0,7	0,9

Απορρόφηση (Abs)	0,816	0,758	0,703	0,482	0,052	0,03	0,029	0,018	0,017	0,014
Ποσοστό (π%) αιμόλυσης	100	92,89	86,15	59,06	6,372	3,676	3,553	2,205	2,083	1,715
	0	216	196	863	549	471	922	882	333	686

**Πίνακας 4.**

Πίνακας τιμών για τον ασθενή με κωδική ονομασία MDS-22 με στρογγυλοποίηση δύο δεκαδικών ψηφίων										
Διάλυμα (δ/μα) NaCl%	0	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5	0,55	0,6	0,7	0,9
Ποσοστό (π%) αιμόλυσης	100	92,89	86,15	59,06	6,372	3,676	3,553	2,205	2,083	1,715



**Εικόνα 6.**

### 3.2.2 Συλλογή και προετοιμασία δειγμάτων

Τα δείγματα των ασθενών με MDS και των υγείων ατόμων (controls) προήλθαν από το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο “ΑΤΤΙΚΟΝ”, σε συνεργασία με την Αιματολογική κλινική και τους υπεύθυνους ιατρούς.

#### **Συλλογή**

Τα δείγματα συλλέχθηκαν σε σωληνάρια ολικού αίματος τα οποία περιείχαν K3 EDTA. Για το παραπάνω πρωτόκολλο ήταν επαρκής μία ποσότητα 500 μL από ένα σωληνάριο.

#### **Προετοιμασία**

Κατά την άφιξη των δειγμάτων στον χώρο του εργαστηρίου ακολουθεί η πρωτοκόλληση τους στο αντίστοιχο βιβλίο με την κατάλληλη κωδική ονομασία (π.χ. για τους ασθενείς με Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα υπάρχει η τυποποίηση MDS-1, MDS-2 κ.λπ. ενώ για τους υγιείς μάρτυρες-controls ίσχυε η τυποποίηση C-1,C-2, κ.λπ.). Στη συνέχεια τα σωληνάρια με τα δείγματα τοποθετούνται στον ρότορα για να ανακινούνται και να μην πήξουν. Με την ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας της πρώτης ημέρας, η οποία διενεργήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, το σωληνάριο Eppendorf με την υπόλοιπη ποσότητα των 300 μL ολικού αίματος τοποθετείται στο υδατόλουτρο των 37°C για 24 ώρες κι έπειτα εκτελείται πάλι το προαναφερθέν πρωτόκολλο.



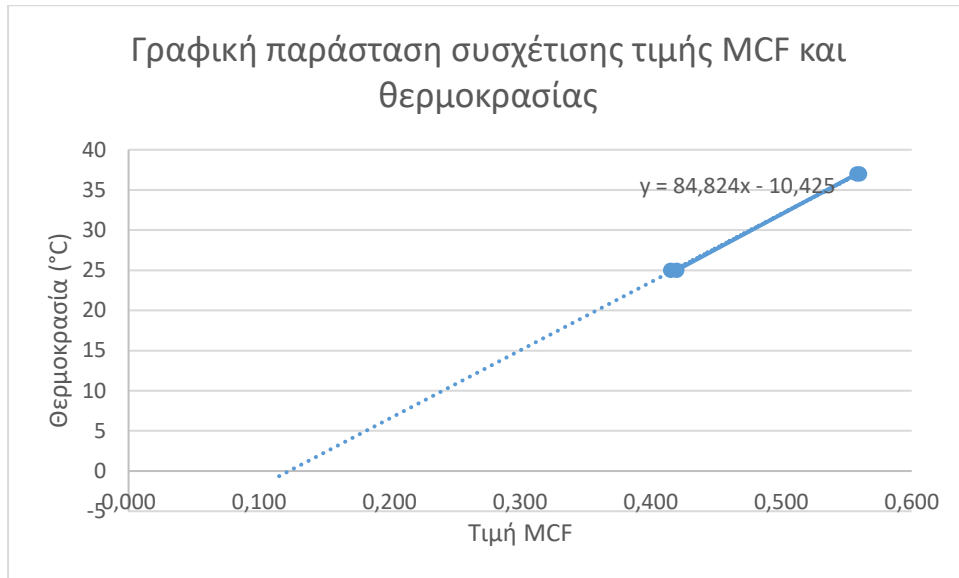
## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

**Πίνακας 5.** Μέση τιμή MCF σε ασθενείς με MDS και σε υγιή άτομα (δεξιά των συμβόλων  $\pm$  αναφέρεται η τυπική απόκλιση)

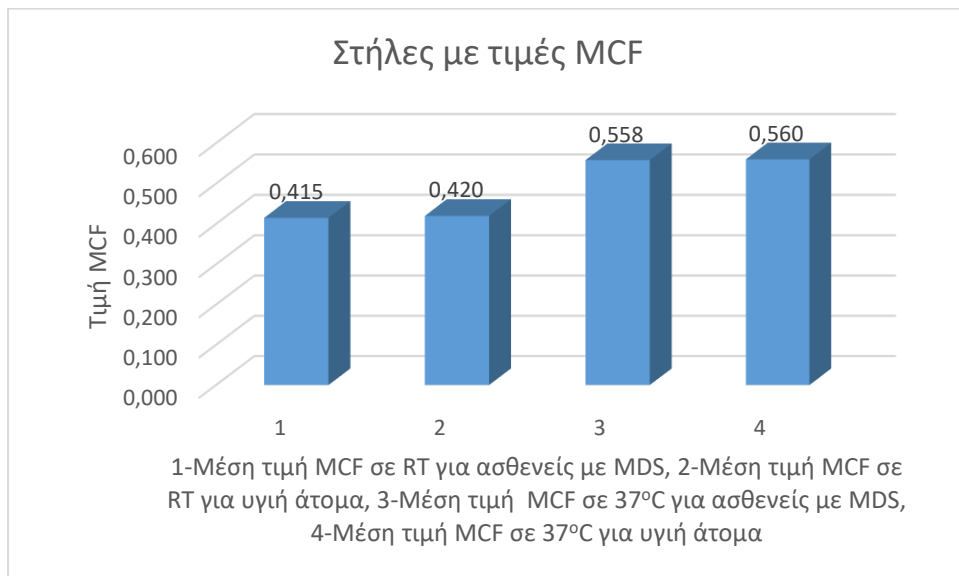
	<b>ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ MDS</b>	<b>ΥΓΙΗ ΑΤΟΜΑ (CONTROLS)</b>
<b>ΑΜΕΣΗ ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ MCF ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΠΩΑΣΗ ΣΕ RT (ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΔΩΜΑΤΙΟΥ)</b>	0,415 $\pm$ 0,029	0,420 $\pm$ 0,023
<b>ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ MCF ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΠΩΑΣΗ ΣΤΟΥΣ 37°C ΓΙΑ 24 ΩΡΕΣ</b>	0,558 $\pm$ 0,048	0,560 $\pm$ 0,046

Έπειτα από την σύγκριση των στατιστικών δεδομένων και τον υπολογισμό των μέσων τιμών της MCF παρατηρήθηκε ότι σε θερμοκρασία δωματίου η μέση τιμή MCF των ασθενών με MDS (0,415  $\pm$  0,029) και των υγιών ατόμων (0,420  $\pm$  0,023) δεν εμφάνισαν ουσιαστικές μεταβολές (η διαφορά 0,005 είναι αμελητέα). Επίσης η μέση τιμή MCF των ασθενών με MDS μετά από επώαση στους 37°C (0,558  $\pm$  0,048) και η μέση τιμή MCF των υγιών ατόμων μετά από επώαση στους 37°C (0,560  $\pm$  0,046) δεν εμφάνισαν ουσιαστικές μεταβολές (η διαφορά 0,002 είναι αμελητέα). Επομένως η MCF δεν επηρεάστηκε στα MDS και δεν υπήρξε αυξημένη λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων, καθώς μία MCF στα 0,45 είναι η μέση φυσιολογική τιμή για τα υγιή άτομα. Μία MCF<0,45 υποδηλώνει ανθεκτικά RBCs που δεν αιμολύονται εύκολα σε υπότονα διαλύματα NaCl, ενώ MCF>0,45 υποδηλώνουν εύθραυστα RBCs που αιμολύονται εύκολα σε υπότονα διαλύματα NaCl. Στην αυξημένη θερμοκρασία των 37°C εμφανίστηκε μία ουσιώδης μεταβολή στην μέση τιμή της MCF για κάθε κατηγορία. Δηλαδή η μέση τιμή της MCF για τους ασθενείς με MDS μετά από την επώαση σε RT (0,415  $\pm$  0,029) και η μέση τιμή MCF για τους ασθενείς με MDS μετά από επώαση στους 37°C (0,558  $\pm$  0,048) εμφάνισε μεταβολή 0,143, ενώ η μέση τιμή της MCF για τα υγιή άτομα μετά από την επώαση σε RT (0,420  $\pm$  0,023) και η μέση τιμή MCF για τα υγιή άτομα μετά από την επώαση στους 37°C (0,560  $\pm$  0,046)

εμφάνισε μεταβολή 0,140. Αυτό προέκυψε από το γεγονός ότι τα RBCs με την αύξηση της θερμοκρασίας παρουσιάζουν αυξημένη ευθραυστότητα και συνεπώς αιμολύονται.



**Εικόνα 7.**



**Εικόνα 8.**

## 5. Συζήτηση

### 5.1 Η ωσμωτική αντίσταση σε ασθενείς με SARS-CoV-2 και Δρεπανοκυτταρική Νόσο

Για να ελεγχθεί η ωσμωτική συμπεριφορά των ερυθρών αιμοσφαιρίων, χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης αλατούχου διαλύματος (0,0–0,9% w/v NaCl, SIGMA). Δείγματα αίματος προστέθηκαν σε κάθε αλατούχο διάλυμα (αναλογία 1:100, αντίστοιχα) και επώστηκαν για 15 λεπτά στους 20 °C. Μετά από φυγοκέντρηση στα 200 g για 5 λεπτά, η Hb (αιμοσφαιρίνη) που απελευθερώθηκε στο υπερκείμενο μετρήθηκε στα 540 nm και σχεδιάστηκε σε γραφική παράσταση έναντι της συγκέντρωσης αλατούχου διαλύματος για να παραχθεί μια καμπύλη ωσμωτικής ευθραυστότητας για κάθε δείγμα. Η MCF, η οποία αντιστοιχεί στη συγκέντρωση φυσιολογικού ορού που προκαλεί το 50% της αιμόλυσης, υπολογίστηκε από τις καμπύλες. (20)

Στην παρούσα μελέτη παρατηρείται μειωμένος αριθμός ενδοκυτταρικού  $Ca^{2+}$  των RBCs (μέσος όρος  $\pm$  τυπική απόκλιση)  $886 \pm 378$  στους ασθενείς με MDS σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες ελέγχου  $1.023 \pm 600$ , ενώ και ο δείκτης μηχανικής ευθραυστότητας των ερυθρών αιμοσφαιρίων (MFI) που σχετίζεται με την ευθραυστότητα των κυττάρων στο μηχανικό στρες παρουσιάζεται μειωμένος στους ασθενείς με MDS  $1,73 \pm 0,74$ , σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες  $2,28 \pm 0,97$ . Παράλληλα οι ενδοκυττάρια δραστικές μορφές οξειγόνου (iROS) στο RBC για τους ασθενείς με MDS είναι αυξημένες  $635 \pm 279$  σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες  $519 \pm 203$ . Συνεπώς, η παρούσα μελέτη έρχεται σε αντίθεση με την έρευνα της Bouchla et al. για τον SARS-CoV-2 σχετικά με τα δεδομένα του ενδοκυτταρικού  $Ca^{2+}$  των RBCs και του δείκτη μηχανικής ευθραυστότητας των ερυθρών αιμοσφαιρίων (MFI) αλλά ταυτίζεται για τα αυξημένα επίπεδα iROS.

Η έρευνα της Bouchla et al. προτείνει ότι ο SARS-CoV-2 προκαλεί οξειδωτικό στρες RBC, αυξάνει το ενδοκυτταρικό  $Ca^{2+}$  και την ευθραυστότητα των κυττάρων στο μηχανικό στρες. Η ακριβής σειρά των γεγονότων δεν μπορεί να διευκρινιστεί. Ωστόσο, είναι γνωστό ότι δευτερογενώς στη σήψη οι αυξημένες ενδοκυττάρια

δραστικές μορφές οξυγόνου (iROS) στο RBC έχουν ως αποτέλεσμα μειωμένη παραμόρφωση του RBC, η οποία συνίσταται σε συρρίκνωση του κυττάρου, σε φυσαλίδες της μεμβράνης και ανακάτεμα της κυτταρικής μεμβράνης, μια διαδικασία που αναφέρεται ως ερυθρόπτωση. Αυτό μπορεί να μεταφραστεί σε αυξημένη μηχανική ευθραυστότητα και λύση του RBC, όπως παρατηρείται σε αυτή την περίπτωση. (21)

Οι ασθενείς με MDS όπως και οι ασθενείς με SCD παρουσίασαν μειωμένο αριθμό RBCs  $3,66 \pm 0,77 \times 10^6/\mu\text{L}$  (φυσιολογικές τιμές  $4,2-6,1 \times 10^6/\mu\text{L}$ ), αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων (WBCs)  $6,11 \pm 3,14 \times 10^3/\mu\text{L}$  (φυσιολογικές τιμές  $4,00-10,00 \times 10^3/\mu\text{L}$ ), αιματοκρίτη (Hct)  $33,1 \pm 4,5\%$  (φυσιολογικές τιμές  $37,0-52,0\%$ ), μειωμένη αιμοσφαιρίνη (Hb)  $10,2 \pm 1,4 \text{ g/dL}$  (φυσιολογικές τιμές  $12,0-15,0 \text{ g/dL}$ ) και αυξημένο εύρος κατανομής ερυθρών αιμοσφαιρίων (RDW)  $16,7 \pm 4,8\%$  (φυσιολογικές τιμές  $11,5-16,0\%$ ) από τους αντίστοιχους υγιείς μάρτυρες ελέγχου που εμφάνισαν αριθμό RBCs  $4,50 \pm 0,74 \times 10^6/\mu\text{L}$  (φυσιολογικές τιμές  $4,2-6,1 \times 10^6/\mu\text{L}$ ), λευκών αιμοσφαιρίων (WBCs)  $7,91 \pm 4,02 \times 10^3/\mu\text{L}$ , αιματοκρίτη (Hct)  $38,9 \pm 4,5\%$  (φυσιολογικές τιμές  $37,0-52,0\%$ ), αιμοσφαιρίνη (Hb)  $11,9 \pm 1,6 \text{ g/dL}$  που είναι ελάχιστα κάτω από το φυσιολογικό όριο (φυσιολογικές τιμές  $12,0-15,0 \text{ g/dL}$ ) και εύρος κατανομής ερυθρών αιμοσφαιρίων (RDW)  $14,6 \pm 2,0\%$  (φυσιολογικές τιμές  $11,5-16,0\%$ ). Όμως ενώ στην SCD οι ασθενείς παρουσιάζουν ωσμωτική αιμόλυση χαμηλότερη από αυτή των υγιών μαρτύρων στα MDS η MCF είναι σχεδόν ίση (Πίνακας 5). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα προξενούσε η μελέτη στα MDS διαφόρων βιοχημικών δεικτών που σχετίζονται με την αιμόλυση αλλά και διαφόρων δεικτών αιμόστασης και πήξης.

Οι ασθενείς με SCD χαρακτηρίζονται ως αναιμικοί λόγω μειωμένου αριθμού RBCs, ενδοκυτταρικής Hb και αιματοκρίτη, αλλά με ένα αυξημένο εύρος κατανομής ερυθρών αιμοσφαιρίων (RDW). Εκτός από τα υψηλότερα επίπεδα HbF και HbS, βρέθηκαν περισσότερα δικτυοερυθροκύτταρα στα δείγματα SCD. Ενώ ο πλήρης αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων δεν διέφερε από αυτόν των μαρτύρων, η αναλογία μονοκυττάρων και βασεόφιλων βρέθηκε αυξημένη. Η βιοχημική ανάλυση έδειξε ότι οι δείκτες της αιμόλυσης, όπως η χολερυθρίνη και η γαλακτική αφυδρογονάση, μαζί με δείκτες της φλεγμονής (φερριτίνη, C-αντιδρώσα πρωτεΐνη) και της ηπατικής λειτουργίας (π.χ. αλκαλική φωσφατάση και γ-

γλουταμυλοτρανσφεράση), παρουσίασαν επίσης υψηλότερες τιμές στον ορό των ασθενών με SCD σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Αρκετές παράμετροι αιμόστασης και πήξης, συμπεριλαμβανομένων των επιπέδων των D-dimers και του παράγοντα von Willebrand, και της προπηκτικής δραστηριότητας των εξωκυττάρων κυστιδίων (extracellular vesicles-EVs), ήταν αυξημένες στην ακολουθία της νόσου. Τέλος, η ελεύθερη Hb και η αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος ήταν υψηλότερες σε ασθενείς με SCD, μαζί με το φορτίο των ROS των ερυθρών αιμοσφαιρίων τους, ενώ η ωσμωτική αιμόλυση ήταν χαμηλότερη. (22)

### 5.2 Η ωσμωτική αντίσταση των ερυθρών αιμοσφαιρίων–Νανοϋλικά

Όπως και στα MDS, έτσι και στα νανοϋλικά μεσοπορώδους πυριτίου, η αλληλεπίδραση τους με τα RBCs δεν διαφαίνεται να επηρεάζει την ωσμωτική ευθραυστότητα (OF), καθώς η τιμή MCF δεν μεταβάλλεται ουσιαστικά και στις δύο περιπτώσεις.

Μια δοσοεξαρτώμενη αύξηση στα επίπεδα της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης του πλάσματος (p-F-Hb, Plasma free hemoglobin) παρατηρείται σε συγκεντρώσεις των νανοϋλικών μεσοπορώδους πυριτίου (mesoporous silica nanomaterials-MSNs) πάνω από 0,025 mg/mL. Το Sil (Πυρίτιο) δείχνει μια τάση προς μειωμένα επίπεδα αιμόλυσης μετά την επώαση με ερυθρά αιμοσφαίρια και τα εμπλουτισμένα με Δημήτριο MSNs φαίνεται να τα μειώνουν περαιτέρω, αλλά χωρίς στατιστική σημασία. Οι τιμές της p-F-Hb ήταν εντός φυσιολογικών ορίων στον ασκό ολικού αίματος (του μάρτυρα) κατά την αποθήκευση. Όσον αφορά την ωσμωτική ευθραυστότητα των ερυθροκυττάρων, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές μετά την επώαση με MSNs σε όλες τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). (23)

### 5.3 Αποθήκευση του αίματος

Στην παρούσα έρευνα τα δείγματα αίματος των υγιών μαρτύρων ελέγχου οι οποίοι έχουν όμως αυξημένη ηλικία (μέση ηλικία τα 76 έτη) και πιο συγκεκριμένα ο ανδρικός πληθυσμός εμφάνισε αυξημένο αριθμό RBCs ( $5,12 \pm 0,35 \times 10^6/\mu\text{L}$ ), αυξημένη Hb

(13,1±1,2 g/dL) και μειωμένο αριθμό αιμοπεταλίων (PLTs) (240±63 x10<sup>3</sup> /μL) συγκριτικά με τον αντίστοιχο γυναικείο πληθυσμό που παρουσίασε αριθμό RBCs (4,20±0,69 x10<sup>6</sup>/μL), Hb (11,3±1,4 g/dL) και αυξημένο αριθμό αιμοπεταλίων (PLTs) (285±199 x10<sup>3</sup> /μL). Εντούτοις στους ασθενείς με MDS διαφαίνεται ότι ο γυναικείος πληθυσμός έχει ελαφρώς αυξημένες τις τιμές των RBCs (3,79±0,62 x10<sup>6</sup>/μL), της Hb (10,3±1,2 g/dL) και του αριθμού αιμοπεταλίων (PLTs) (213±135 x10<sup>3</sup>/μL) σε σχέση με τον ανδρικό πληθυσμό όπου εμφανίζει RBCs (3,53±0,86 x10<sup>6</sup>/μL), Hb (10,2±1,6 g/dL) και PLTs (209±83 x10<sup>3</sup>/μL). Σχετικά με την εξέταση της MCF των δειγμάτων την ίδια ημέρα μετά από επώαση για μικρό χρονικό διάστημα σε θερμοκρασία δωματίου βρέθηκε ίση σχεδόν στους άνδρες και στις γυναίκες (0,418±0,036 και 0,412±0,018 αντίστοιχα). Όσον αφορά την MCF που εντοπίστηκε μετά την επώαση των ερυθρών αιμοσφαιρίων για 24 ώρες στους 37 °C στα υγιή άτομα του γυναικείου πληθυσμού εμφανίζεται ελάχιστα αυξημένη 0,563±0,048 σε σχέση με τα αντίστοιχα ανδρικά άτομα 0,553±0,043, ενώ και σε γυναίκες με MDS είναι αυξημένη 0,568±0,041 από αυτή των ανδρών 0,549±0,052.

Η σύγκριση του φρέσκου αίματος για τα βασικά αιματολογικά και βιολογικά χαρακτηριστικά του RBC προσδιορίστηκε σε δύο μεγάλες ομάδες νεαρών ανδρών και γυναικών υποψηφίων υγιών αιμοδοτών. Αν και εντός του φυσιολογικού εύρους, εντοπίστηκαν σημαντικές διαφορές σε αρκετές μεταβλητές μεταξύ των δύο ομάδων. Η πιο εμφανής διαφορά ήταν ότι οι γυναίκες εμφάνισαν χαμηλότερα ( $p=1,7 \times 10^{-17}$ ) επίπεδα Hb, αριθμό RBCs και σιδήρου ορού αλλά υψηλότερα επίπεδα αριθμού αιμοπεταλίων ( $p=1,7 \times 10^{-10}$ ). Οι γυναίκες κατέδειξαν χαμηλότερα επίπεδα ελεύθερης Hb σε σύγκριση με τους άνδρες (13,48±6,49 έναντι 34,68±11,99 mg/dL, αντίστοιχα,  $p=1,48 \times 10^{-10}$ ), ειδικά, εμφάνισαν υψηλότερο MCF (0,439±0,023 έναντι 0,403±0,029% NaCl, γυναίκες έναντι ανδρών,  $p=2 \times 10^{-8}$ ). Μετά την επώαση των ερυθρών αιμοσφαιρίων για 24 ώρες στους 37 °C, τα θηλυκά RBCs παρουσίασαν χαμηλότερες τιμές MCF, τόσο in vivo όσο και κατά την πρώιμη αποθήκευση (π.χ. ημέρα 14, 0,508±0,020 έναντι 0,598±0,048 % NaCl,  $p=10^{-4}$ , γυναίκες έναντι ανδρών).  
(24)

Αναμφίβολα η διαδικασία της ωσμωτικής αντίστασης και κατ' επέκταση της ωσμωτικής αιμόλυσης των RBCs μπορεί να καταδείξει την ποιότητά τους είτε κατά

την άμεση διαχείριση τους είτε μετά από την αποθήκευσή τους. Όπως διαφαίνεται από το Κεφάλαιο 4 η επώαση των ερυθρών αιμοσφαιρίων για 24 ώρες στους 37 °C αυξάνει αρκετά την MCF σε σχέση με την MCF των άμεσων ερυθρών αιμοσφαιρίων που βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου και σε αυτό συμβάλουν δυο παράγοντες, οι οποίοι είναι η αύξηση της θερμοκρασίας και ο χρόνος αποθήκευσής τους. Επιπλέον στα RBCs τόσο των ασθενών με MDS όσο και σε αυτά των υγιών μαρτύρων θα ήταν χρήσιμο να μελετηθούν σε κάποια μελλοντική έρευνα διάφορα αντιοξειδωτικά μόρια, οι iROS, τα εξωκυτταρικά κυστίδια (EVs), αρκετοί δείκτες στρες όπως το γαλακτικό και η υπεροξειδεδοξίνη 2 αλλά και οι δείκτες μείωσης της ενέργειας (AMP,ADP,ATP) σε σχέση με την MCF σε όλη την χρονική διάρκεια της αποθήκευσης τους (RBCs).

Σύμφωνα με την ανάλυση της καμπύλης ROC, η ωσμωτική, η μηχανική και η αιμόλυση αποθήκευσης έχουν πολύ καλές δυνατότητες να προβλέψουν την κατάσταση των αιμοδοτών ετεροζυγωτών για βήτα θαλασσαιμία (bThal+) σε κάθε χρονικό σημείο αποθήκευσης. Μόνο η ωσμωτική ευθραυστότητα (η οποία ακολουθεί μια λογαριθμική αύξηση κατά την αποθήκευση) ήταν χαμηλότερη στους bThal+ έναντι των RBCs ελέγχου in vivo. Εκτός από την αιμόλυση, το εξωκυτταρικό K<sup>+</sup> ήταν επίσης χαμηλότερο στο πλάσμα των bThal+ και στο υπερκείμενο της ημέρας 42. Η προκαταρκτική πρωτεομική ανάλυση αποκάλυψε διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων στην αφθονία των πρωτεϊνών της μεμβράνης που σχετίζονται φυσιολογικά με τον έλεγχο όγκου των RBCs/την ομοιόσταση των κατιόντων, συμπεριλαμβανομένων των piezo-1, ATPάση Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> και υδατοπορίνη-1. (25)

Η ωσμωτική αιμόλυση τονίζεται ως παράμετρος «κέντρο» στα συμπλέγματα των bThal+, με σημαντικές διαφορές στον τύπο και τον αριθμό των συνδέσεων μεταξύ των ομάδων. Η ωσμωτική ευθραυστότητα των αποθηκευμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων των bThal+ εμφάνισε ισχυρές συσχετίσεις με αρκετές βιοχημικές (π.χ. τρανσφερίνη, r=0,560, P<0,01), κυτταρικές (π.χ. μηχανική αιμόλυση RBC, r=0,771, P<0,01), πρωτεϊνικές και μεταβολικές (π.χ. L-αργινίνη, r=0,697, 1-φωσφορική σφιγγοσίνη, r=-0,636, P<0,01) παραμέτρους των RBCs των bThal+ και του πλάσματος, σε εντυπωσιακή αντίθεση με τους μάρτυρες ελέγχου. Ιδιαίτερα, στην περίπτωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων του bThal+, η διακύμανση της ευθραυστότητας κατά τη

διάρκεια της αποθήκευσης συσχετίστηκε λιγότερο με τα επίπεδα λιπαρών οξέων in vivo, αλλά περισσότερο με αυτά των καρβοξυλικών οξέων, σε σύγκριση με τον μάρτυρα ελέγχου. Παρά τις προαναφερθείσες διαφορές, η ωσμωτική αιμόλυση κατά την αποθήκευση βρέθηκε συσχετιζόμενη in vivo με τα επίπεδα των δεικτών γήρανσης του RBC και τον ενεργειακό μεταβολισμό και στις δύο ομάδες δότες. Σε ομοιότητα με το σύμπλεγμα της MCF, η εξωκυτταρική αντιοξειδωτική ικανότητα των μονάδων του bThal+ παρουσίασε υψηλότερη συνεκτικότητα με βασικές παραμέτρους σε σύγκριση με τον μάρτυρα ελέγχου (διπλάσιος αριθμός συνοχής) συμπεριλαμβανομένων αρκετών μεταβολιτών του ενεργειακού μεταβολισμού (π.χ. D-γλυκόζη/ εξαρτώμενες από το ουρικό οξύ αντιοξειδωτικές ικανότητες-UAdAC,  $r=-0,705$ ,  $P < 0,01$ ), της οξείδωσης των πουρινών (π.χ., TAC/5-υδροξυϊσοουρικό,  $r=0,756$ ,  $P < 0,01$ ), του κύκλου της ουρίας (π.χ. ορνιθίνη/UAdAC,  $r=-0,769$ ,  $P < 0,01$ ) και των καρνιτινών. Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι η βασική φυσιολογία του bThal+ σχετίζεται έντονα και εγγενώς με τη μοναδική αντίσταση στην ωσμωτική αιμόλυση και την υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα των μονάδων RBCs κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. (25)

Η εξαρτώμενη από το ουρικό οξύ αντιοξειδωτική ικανότητα (UA-AC), μαζί με άλλες αντιοξειδωτικές μεταβλητές, όπως η γλουταθειόνη (GSH) και οι φυσιολογικές ιδιότητες του RBC, όπως η ωσμωτική ευθραυστότητα, μπορεί να θεωρηθεί με ασφάλεια ένα συνδεδεμένο με τον δότη και in vivo μετρήσιμο χαρακτηριστικό με τη δυνατότητα να αποκαλύψει ποιοτικά χαρακτηριστικά των αποθηκευμένων μονάδων RBC. (26)

Η ωσμωτική ευθραυστότητα των αποθηκευμένων RBCs αυξήθηκε ουσιαστικά κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, αλλά ήταν σημαντικά χαμηλότερη ( $p < 0,01$ ) σε μονάδες ολικού αίματος (WB) από ό,τι στα συμπυκνωμένα ερυθρά αιμοσφαίρια (PRBCs) (ανεξαρτήτως των επιπέδων αιμόλυσής τους), καθ' όλη την περίοδο αποθήκευσης. Στα PRBCs, παρόμοιες τιμές δείκτη MCF καταγράφηκαν μεταξύ μονάδων χαμηλής και υψηλής αιμόλυσης μέχρι τα μέσα της αποθήκευσης ( $0,530 \pm 0,024\%$  και  $0,523 \pm 0,024\%$  NaCl, αντίστοιχα), αλλά προς τις τελευταίες ημέρες, η ευθραυστότητα των αιμολυμένων μονάδων PRBC υπερέβη αυτή των μη αιμολυμένων ( $0,574 \pm 0,021\%$  έναντι  $0,558 \pm 0,022\%$  NaCl,  $p < 0,01$ ). Επιπλέον, και σε ομοιότητα με προηγούμενα



ευρήματα σε μονάδες λευκαφαιρεμένων PRBCs με που αποθηκεύτηκαν σε CPD-SAGM, η ανοδική διακύμανση του δείκτη MCF κατά την αποθήκευση στο CPDA-1 ήταν ανάλογη με τις τιμές που σχετίζονται με τον δότη των δειγμάτων της ημέρας 2 σε όλες τις υπό εξέταση μονάδες, ενώ ισχυρές και στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των τιμών MCF που αντιστοιχούν στα τρία χρονικά σημεία που δοκιμάστηκαν υπήρχαν στις μονάδες WB και PRBC, ανεξάρτητα από τα επίπεδα αιμόλυσης (<0,8% ή >0,8%). (20)

Παρατηρείται αμελητέα διακύμανση στην αιμόλυση ή την ωσμωτική ευθραυστότητα μεταξύ των μονάδων αίματος ως συνάρτηση της ταξινόμησης ομάδας αίματος ABO ή Rhesus (τα δεδομένα δεν φαίνονται). Αντίθετα, ήπιες αλλά στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της αιμόλυσης και των επιπέδων MCF βρέθηκαν για την ομάδα μονάδων PRBC με αιμόλυση κάτω από 0,8% καθ' όλη την περίοδο αποθήκευσης. Με βάση την εκτίμηση της τιμής  $R^2$ , η διακύμανση της ωσμωτικής ευθραυστότητας είναι ένα εγγενές μέρος της διακύμανσης της αιμόλυσης στα PRBCs χαμηλής αιμόλυσης συνεχώς καθ' όλη τη διάρκεια της αποθήκευσης, σε ποσοστό περίπου 11%. Αντιθέτως, δεν υπήρχε συσχέτιση μεταξύ των δύο μεταβλητών που δοκιμάστηκαν στις μονάδες PRBC που υπερέβαιναν τα επίπεδα αιμόλυσης εντός ασκού κατά 0,8% ή σε μονάδες WB. (20)

Αρκετοί φαινότυποι γήρανσης RBC είναι εμφανείς υπό την αποθήκευση. Η δημιουργία εξωκυτταρικών κυστιδίων (EVs) είναι ένας σημαντικός μηχανισμός ομοιόστασης που βοηθά τα RBC να απορρίπτουν οξειδωμένα ή τοξικά μόρια που συσσωρεύονται με το χρόνο αποθήκευσης. Αν και είναι εξαιρετικά ωφέλιμο και «σωτήριο» στην αρχή, η υπερβολική αποβολή των τμημάτων της μεμβράνης οδηγεί αναπόφευκτα σε λιγότερο παραμορφώσιμα και μορφολογικά αλλοιωμένα RBCs που είναι πιο επιρρεπή σε λύση. Αρκετά στοιχεία υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η απορρύθμιση του μεταβολισμού, τόσο της ενέργειας όσο και της οξειδοαναγωγής, στα αποθηκευμένα ερυθρά αιμοσφαίρια, σχετίζεται με την παραγωγή EVs κατά την πρώιμη περίοδο αποθήκευσης, ενώ η διαταραχή της μεμβράνης και του κυτταροσκελετού θα μπορούσε να φέρει την ευθύνη για την κυστιδοποίηση αργότερα. Η απελευθέρωση της ελεύθερης Hb και της Hb που περιέχει (EVs) είναι οι κύριες πτυχές της αλλοίωσης στην αποθήκευση. Η αιμόλυση και η κυστιδοποίηση

επηρεάζονται τόσο από τη στρατηγική της αποθήκευσης που ακολουθείται, όσο και από τη διάρκεια της αποθήκευσης και επιπλέον, αυτά τα δύο φαινόμενα φαίνεται να αλληλοσυσχετίζονται τόσο στα αποθηκευμένα όσο και στα νοσούντα RBCs. Εντούτοις, εκτός από μια μελέτη που δείχνει ότι τουλάχιστον κατά τις πρώτες 21 ημέρες αποθήκευσης το μεγαλύτερο μέρος της εξωκυτταρικής αιμοσφαιρίνης εμπεριέχεται σε EVs, τα στοιχεία που έχουν σχέση με τον συγκεκριμένο χωροχρονικό τρόπο απώλειας Hb (διαλυτή ή εμπεριεχομένη σε κυστίδια) κατά την αποθήκευση δεν έχουν μελετηθεί. (27)

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι συστατικά του κυτταροσκελετού, όπως η σπεκτρίνη, καθώς και μια ποικιλία από καρνιτίνες και αλβουμίνη συσχετίστηκαν αρνητικά με την αιμόλυση μετά την ανασύσταση των αιμοδοτών με χαρακτηριστικά β-θαλασσαιμίας (βThal+) και των ερυθρών αιμοσφαιρίων ελέγχου. Αυτό συνέβη επίσης για τα αντιοξειδωτικά μόρια και το ενδοκυτταρικό ATP, ενώ το αντίθετο μοτίβο παρατηρήθηκε για το NADP+ και αρκετούς δείκτες στρες, όπως το γαλακτικό (σε βThal+) και την υπεροξειρεδοξίνη 2 που είναι συνδεδεμένη με την μεμβράνη. Η ωσμωτική αιμόλυση των ανασυσταθέντων ερυθρών αιμοσφαιρίων ήταν ανάλογη με εκείνη της αποθήκευσης και στις δύο ομάδες-δότες και περαιτέρω συσχετιζόταν με τη μηχανική αιμόλυση σε ετεροζυγώτες. Για άλλη μια φορά, η συσχέτιση με τις παραμέτρους της μεμβράνης και του κυτταροσκελετού, μαζί με πολλά συστατικά, ήταν παγκοσμίως εμφανής. Ενώ τα επίπεδα αποθήκευσης των ενδοκυτταρικών ROS και ADP (σε βThal+) παρουσίασαν θετική συσχέτιση με την ωσμωτική αιμόλυση, η παρουσία πρωτεοστατικών μορίων στη μεμβράνη οδήγησε σε αρνητικές συσχετίσεις. Προχωρώντας, τόσο η ωσμωτική όσο και η μηχανική ευθραυστότητα των αποθηκευμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων των βThal+ συσχετίστηκαν θετικά με τη μηχανική αιμόλυση μετά την ανάμιξη, ενώ πολλά μέλη του κυτταροσκελετού, όπως η μυσίνη-9 και το μηχανοευαίσθητο κανάλι piezo-1 παρουσίασαν αρνητικές ή θετικές συσχετίσεις, αντίστοιχα και οι δύο ομάδες. Οι δείκτες στρες (π.χ. γαλακτικό) και η μείωση της ενέργειας (π.χ. AMP) είχαν περαιτέρω θετικές συσχετίσεις με τη μηχανική ευθραυστότητα, ενώ η παρουσία μεταβολιτών της γλυκόλυσης, όπως η 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη έδειξε την αντίθετη σχέση. Τέλος, παρόλο που τα επίπεδα αποθήκευσης ROS συσχετίστηκαν θετικά με την οξειδωτική αιμόλυση μετά

την ανασύσταση, ανεξάρτητα από τον δότη, τα επίπεδα οξειδωτικής αιμόλυσης στην αποθήκευση και μετά την ανάμιξη<sup>2</sup> ενδοσυσχετίστηκαν μόνο στην ομάδα των μαρτύρων. Τα αντιοξειδωτικά μόρια, όπως η καταλάση, και μια αφθονία πρωτεϊνών που σχετίζονται με την πρωτεόσταση (η διατήρηση της ομοιοστασίας του πρωτεόματος) (π.χ. υπομονάδες πρωτεασώματος, HSPs) συσχετίστηκαν αντίστροφα με την οξειδωτική αιμόλυση, ενώ τα επίπεδα AMP προσέφεραν μία θετική συσχέτιση. (28)

Σε μελέτη που αφορά την ωσμωτική αιμόλυση, τα επίπεδα προ-αποθήκευσης ήταν ανάλογα με εκείνα των καταστάσεων αποθήκευσης και μετά την αποθήκευση *in vitro*, με μια ενδιαφέρουσα ισχυρή ενδοσυσχετιστική σύνδεση μεταξύ των αποθηκευμένων και των ανασυσταθέντων δειγμάτων (Εικόνα 1A)(6). Αυτή η μελέτη έρχεται σε αντίθεση με τις υπόλοιπες μελέτες αλλά και με την παρούσα μελέτη για την ωσμωτική αιμόλυση στα MDS.

Τα επίπεδα MCF φρέσκων και μακροχρόνια αποθηκευμένων RBCs συσχετίζονται σημαντικά μεταξύ τους σε όλες τις στρατηγικές αποθήκευσης και τις ομάδες δοτών. Η ωσμωτική ευθραυστότητα των ερυθρών αιμοσφαιρίων στη μέση/όψιμη αποθήκευση μπορεί επίσης να «προβλεφθεί» από τα επίπεδα MCF των πρώιμων αποθηκευμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων. Αυτή η παρατήρηση ήταν εμφανής σε όλες τις υποομάδες μίας μελέτης (π.χ. CPD/SAGM: ημέρα 2–21,  $r=0,870$ ,  $p<10^{-20}$  και άνδρες: ημέρα 2–21,  $r=0,743$ ,  $p<10^{-20}$ ). Η MCF οποιουδήποτε προηγούμενου χρονικού σημείου αποθήκευσης ήταν ευθέως ανάλογη με αυτό των επερχόμενων (π.χ. CPD/SAGM: ημέρα 14–35,  $r=0,859$ , ημέρα 21–42,  $r=0,883$ ,  $p<10^{-20}$  και για τα δύο). Επίσης στην ίδια μελέτη το σύμπλεγμα δειγμάτων με την πιο χαμηλή MCF (περίπου 10% των δοτών, φορείς βήτα-θαλασσαιμικών χαρακτηριστικών) παρουσίασε σημαντικά χαμηλότερη αιμόλυση ( $p<0,01$ ) στην αποθήκευση σε σύγκριση με το σύμπλεγμα με την ανώτερη υψηλή MCF (περίπου 10% των

---

<sup>2</sup> Για να εξεταστεί η απόδοση των ερυθρών αιμοσφαιρίων των βThal<sup>+</sup> μετά την αποθήκευση, τα αποθηκευμένα βThal<sup>+</sup> και τα ερυθρά αιμοσφαίρια ελέγχου ανασυστάθηκαν σε πλάσμα που δόθηκε από β-θαλασσαιμικούς ασθενείς που εξαρτώνται από μετάγγιση και υγιείς μάρτυρες και επωάστηκαν για 24 ώρες σε θερμοκρασία σώματος.

δειγμάτων, τα περισσότερα από αυτά με μη λευκαφαιρεμένες μονάδες RBCs σε CPDA-1). (29)

## 6. Βιβλιογραφία:

1. Walski T, Chludzinska L, Komorowska M, Witkiewicz W. Individual osmotic fragility distribution: a new parameter for determination of the osmotic properties of human red blood cells. *Biomed Res Int.* 2014;2014:162102.
2. Kuo MS, Chuang CH, Cheng HC, Lin HR, Wang JS, Hsu K. Different Involvement of Band 3 in Red Cell Deformability and Osmotic Fragility-A Comparative GP.Mur Erythrocyte Study. *Cells.* 2021;10(12).
3. Penha-Silva N, Firmino CB, de Freitas Reis FG, da Costa Huss JC, de Souza TM, de Freitas MV, et al. Influence of age on the stability of human erythrocyte membranes. *Mech Ageing Dev.* 2007;128(7-8):444-9.
4. Zhirnov VV, Iakovenko IN. The osmotic resistance, and zeta potential responses of human erythrocytes to transmembrane modification of Ca<sup>2+</sup> fluxes in the presence of the imposed low rate radiation field of <sup>90</sup>Sr. *Int J Radiat Biol.* 2015;91(1):117-26.
5. D'Alessandro A, Anastasiadi AT, Tzounakas VL, Nemkov T, Reisz JA, Kriebardis AG, et al. Red Blood Cell Metabolism In Vivo and In Vitro. *Metabolites.* 2023;13(7).
6. Anastasiadi AT, Arvaniti VZ, Paronis EC, Kostomitsopoulos NG, Stamoulis K, Papassideri IS, et al. Corpuscular Fragility and Metabolic Aspects of Freshly Drawn Beta-Thalassemia Minor RBCs Impact Their Physiology and Performance Post Transfusion: A Triangular Correlation Analysis In Vitro and In Vivo. *Biomedicines.* 2022;10(3).
7. Cappellini MD, Taher AT, Verma A, Shah F, Hermine O. Erythropoiesis in lower-risk myelodysplastic syndromes and beta-thalassemia. *Blood Rev.* 2023;59:101039.
8. Verma A, Suragani RN, Aluri S, Shah N, Bhagat TD, Alexander MJ, et al. Biological basis for efficacy of activin receptor ligand traps in myelodysplastic syndromes. *J Clin Invest.* 2020;130(2):582-9.
9. Georgatzakou HT, Fortis SP, Papageorgiou EG, Antonelou MH, Kriebardis AG. Blood Cell-Derived Microvesicles in Hematological Diseases and beyond. *Biomolecules.* 2022;12(6).
10. Weber S, Parmon A, Kurrle N, Schnutgen F, Serve H. The Clinical Significance of Iron Overload and Iron Metabolism in Myelodysplastic Syndrome and Acute Myeloid Leukemia. *Front Immunol.* 2020;11:627662.

11. Angelucci E, Cianciulli P, Finelli C, Mecucci C, Voso MT, Tura S. Unraveling the mechanisms behind iron overload and ineffective hematopoiesis in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res.* 2017;62:108-15.
12. Reimer KA, Neugebauer KM. Blood Relatives: Splicing Mechanisms underlying Erythropoiesis in Health and Disease. *F1000Res.* 2018;7.
13. Nachtkamp K, Kobbe G, Gattermann N, Germing U. Myelodysplastic Syndromes. *Dtsch Arztebl Int.* 2023;120(12):203-10.
14. Hasserjian RP. Myelodysplastic Syndrome Updated. *Pathobiology.* 2019;86(1):7-13.
15. Zini G. Diagnostics and Prognostication of Myelodysplastic Syndromes. *Ann Lab Med.* 2017;37(6):465-74.
16. Patnaik MM, Tefferi A. Refractory anemia with ring sideroblasts (RARS) and RARS with thrombocytosis: "2019 Update on Diagnosis, Risk-stratification, and Management". *Am J Hematol.* 2019;94(4):475-88.
17. Cazzola M. Ineffective erythropoiesis and its treatment. *Blood.* 2022;139(16):2460-70.
18. Salvagno GL, Demonte D, Dima F, Bovo C, Lippi G. Stability of refrigerated whole blood samples for osmotic fragility test. *Hematol Transfus Cell Ther.* 2020;42(2):134-8.
19. Penman BS, Gupta S, Weatherall DJ. Epistasis and the sensitivity of phenotypic screens for beta thalassaemia. *Br J Haematol.* 2015;169(1):117-28.
20. Tzounakas VL, Anastasiadi AT, Karadimas DG, Zeqo RA, Georgatzakou HT, Pappa OD, et al. Temperature-dependent haemolytic propensity of CPDA-1 stored red blood cells vs whole blood - Red cell fragility as donor signature on blood units. *Blood Transfus.* 2017;15(5):447-55.
21. Bouchla A, Kriebardis AG, Georgatzakou HT, Fortis SP, Thomopoulos TP, Lekkakou L, et al. Red Blood Cell Abnormalities as the Mirror of SARS-CoV-2 Disease Severity: A Pilot Study. *Front Physiol.* 2021;12:825055.
22. Giannaki A, Georgatzakou H, Fortis SP, Anastasiadi AT, Pavlou EG, Nomikou EG, et al. Stratification of beta(S)beta(+) Compound Heterozygotes Based on L-Glutamine Administration and RDW: Focusing on Disease Severity. *Antioxidants (Basel).* 2023;12(11).

23. Fortis SP, Batrinou A, Georgatzakou HT, Tsamesidis I, Alvanidis G, Papageorgiou EG, et al. Effect of silica-based mesoporous nanomaterials on human blood cells. *Chem Biol Interact.* 2024;387:110784.
24. Tzounakas VL, Anastasiadi AT, Drossos PV, Karadimas DG, Valsami SE, Stamoulis KE, et al. Sex-related aspects of the red blood cell storage lesion. *Blood Transfus.* 2021;19(3):224-36.
25. Tzounakas VL, Anastasiadi AT, Stefanoni D, Cendali F, Bertolone L, Gamboni F, et al. Beta thalassemia minor is a beneficial determinant of red blood cell storage lesion. *Haematologica.* 2022;107(1):112-25.
26. Tzounakas VL, Karadimas DG, Anastasiadi AT, Georgatzakou HT, Kazepidou E, Moschovas D, et al. Donor-specific individuality of red blood cell performance during storage is partly a function of serum uric acid levels. *Transfusion.* 2018;58(1):34-40.
27. Tzounakas VL, Anastasiadi AT, Lekka ME, Papageorgiou EG, Stamoulis K, Papassideri IS, et al. Deciphering the Relationship Between Free and Vesicular Hemoglobin in Stored Red Blood Cell Units. *Front Physiol.* 2022;13:840995.
28. Anastasiadi AT, Paronis EC, Arvaniti VZ, Velentzas AD, Apostolidou AC, Balafas EG, et al. The Post-Storage Performance of RBCs from Beta-Thalassemia Trait Donors Is Related to Their Storability Profile. *Int J Mol Sci.* 2021;22(22).
29. Tzounakas VL, Anastasiadi AT, Valsami SI, Stamoulis KE, Papageorgiou EG, Politou M, et al. Osmotic hemolysis is a donor-specific feature of red blood cells under various storage conditions and genetic backgrounds. *Transfusion.* 2021;61(9):2538-44.